FACULTE DE MEDECINE DE DIJON

Année 1974 - N° 45

RECHERCHE D'UN INDEX BIOCHIMIQUE DE L'AGE GESTATIONNEL

ETUDE DES GLYCERIDES CELLULAIRES DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

T H E S E

présentée

à la Faculté de Médecine de DIJON

et soutenue publiquement le mercredi 18 septembre 1974

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Monsieur Philippe GAMBERT

né le 6 juillet 1949

à DIJON (21)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549827_0016

FACULTE DE MEDECINE DE DIJON

Année 1974 - N*

RECHERCHE D'UN INDEX BIOCHIMIQUE DE L'AGE GESTATIONNEL

ETUDE DES GLYCERIDES CELLULAIRES DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

T H E S E

présentée

à la Faculté de Médecine de DIJON

et soutenue publiquement le mercredi 18 septembre 1974

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Monsieur Philippe GAMBERT

né le 6 juillet 1949

à DIJON (21)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen : M. J.B. BOUHEY
Assesseur : M. A. MARIN
Assesseur : M. R. PUTELAT
Assesseur : M. J.P. DIDIER
Assesseur : M. J. GUERRIN

Professeur honoraire : M.J. GUYOT
Professeur honoraire : M.F. BARON

Professeurs titulaires

Anatomie et organogénèse : P. BARRY
Anatomie pathologique et carcinologie : F. CABANNE, Doyen honoraire
Biochimie : P. PADIEU
Clinique chirurgicale : H. VIARD
Clinique Médicale : P. CORTET
Clinique Obstétricale : J. JAHIER
Clinique Médicale Infantile : M. ALISON
Clinique neuropsychiatrique : J. BALLIVET
Histologie, embryologie cytogénétique : G. RUCART
Médecine légale et toxicologie : A. MARIN
Pathologie chirurgicale : C. FERRY
Pathologie médicale : R. PUTELAT
Physiologie : J. KLEPPING
Biophysique : P. GAILLIARD
Sémiologie médicale : J. B. BOUHEY

Professeurs sans chaire

Anatomie Pathologique : R. MICHIELS
Biochimie : J. DEDREUX

Hépatologie, gastro-entérologie : Cl. KLEPPING
Médecine préventive et santé publique, Hygiène : M. CARON
Maladies infectieuses : F. DESTAING
Parasitologie : Mme Y. ROUGET

Professeur chargé de cours à titre permanent

Bactériologie, Virologie : P. PICHAT

Maîtres de conférences agrégés

Anatomie et Organogénèse : J. M. AUTISSIER
Anesthésiologie : B. CAILLARD
Carcinologie : J. GUERRIN
Chirurgie générale : P. AUPECLE
S. BRIET
N...
Gynécologie et obstétrique : J. SALASC
J.P. FELDMAN
Hématologie et maladies du sang : A. DUZER
Médecine et Chirurgie expérimentale et comparées, Immunologie : F. MARTIN
Médecine interne : M. GAUDET
P. LOUIS

Néphrologie : G. RIFLE
Neurochirurgie : A. THIERRY
Orthopédie, traumatologie, chirurgie plastique et reconstruction : N...
Pédiatrie et génétique médicale : J.L. NIVELON
Pharmacologie : A. ESCOUSSE
Physiologie : J.P. DIDIER
Pneumologie, phtisiologie : L. JEANNIN
Radiologie, radiodiagnostic : J.P. MABILLE
M. WEILLER
Radiologie, radiothérapie : J. CL. HORIOT
Neuroradiologie : D. BINNERT

Professeur associé

Biochimie : W.H.M. MOMMAERTS

Agrégés libres

Dermatologie, Vénéréologie : J.L. CHAPUIS

Ophtalmologie : P.G. MOREAU

Urologie : R. GAYET

La Faculté de Médecine de Dijon déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

JURY DE LA THESE

Président : Professeur P. PADIEU

Membres : Professeur R. PUTELAT

Professeur J. JAHIER

Professeur W.H.M. MOMMAERTS

Professeur Agrégé J.L. NIVELON

A MA FEMME ET A MA FILLE ARMELLE

A MES PARENTS

A MON FRERE

A MON BEAU-PERE

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE
MONSIEUR LE PROFESSEUR P. PADIEU

Il nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre Jury et nous a inspiré le sujet de cette thèse.

Nous lui sommes reconnaissants de l'accueil chaleureux et de la formation reçus dès le début de nos études médicales.

C'est à lui que nous devons l'orientation choisie.

Ce travail ne peut représenter qu'un modeste hommage à la recherche fondamentale telle qu'il la conçoit.

Il nous a fait le grand honneur de nous compter parmi ses élèves.

Qu'il trouve ici l'expression de notre très profonde gratitude et de notre attachement respectueux.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. PUTELAT

Nous lui sommes très reconnaissants de l'enseignement reçu au cours des semestres passés dans son Service.

Il nous a constamment soutenu dans notre voie de fondamentaliste.

Qu'il nous soit permis de lui exprimer notre fidèle et respectueuse gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. JAHIER

Il nous a permis de réaliser notre étude.

Nous avons apprécié ses encouragements et son aide pendant le cheminement de notre travail.

Nous lui exprimons notre gratitude et l'assurance de notre profonde reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR W.H.M. MOMMAERTS

Il nous a montré l'exemple par la clarté et l'humour de son enseignement.

Nous le remercions d'avoir bien voulu s'intéresser à notre travail.

Nous sommes très honorés de le compter parmi nos Juges.

Nous l'assurons de notre profonde gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE J.L. NIVELON

Nous avons apprécié la valeur de son enseignement.

Nous le remercions pour l'honneur qu'il nous fait de nous juger et l'assurons de notre reconnaissance.

A NOS MAITRES DES HOPITAUX DE DIJON

A TOUS NOS MAITRES DE LA FACULTE DE MEDECINE DE DIJON

A MONSIEUR LE PROFESSEUR C. BARON

Il nous a prodigué son enseignement clair et précis en Faculté des Sciences.

Nous lui exprimons notre respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR LE DOCTEUR P. PELIKAN

Qu'il voie dans ce travail, le fruit d'une collaboration enthousiaste et amicale.

Nous l'assurons de notre sincère gratitude.

A MONSIEUR LE DOCTEUR C. LALLEMANT

Nous avons apprécié dès la première année de médecine la rigueur de son esprit, l'étendue de son savoir et son goût pour la synthèse.

Ses conseils avisés nous ont guidés tout au long de la rédaction de ce travail.

Qu'il trouve ici l'expression de notre très profonde reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. PIARD IN MEMORIAM

Il nous a initié à la Science Clinique.

Sa bonté et son dévouement resteront pour nous un exemple permanent.

En hommage très respectueux.

Je tiens à remercier également :

- Messieurs les Assistants et Internes de la Maternité de Dijon

- Mesdemoiselles et Mesdames les Surveillantes de la Maternité de Dijon.

- Mesdemoiselles et Mesdames les Sages-Femmes de la Maternité de Dijon.

- Tous mes Amis du Laboratoire de Monsieur le Professeur P. PADIEU et du Département de Biochimie de l'Université de Dijon.

S O M M A I R E

INTRODUCTION .... p. 3

CHAPITRE I

METHODES ACTUELLES D'ESTIMATION DE LA MATURITE FOETALE PAR EXAMEN DU LIQUIDE AMNIOTIQUE .... p. 7

I. Caractères généraux du liquide amniotique .... p. 8

A. Origine et circulation .... p. 8

1°. Origine .... p. 8

2°. Circulation .... p. 8

B. Volume et composition .... p. 9

1°. Volume .... p. 9

2°. Composition .... p. 9

C. Rôle .... p. 9

D. Amniocentèse .... p. 10

II. Etude du surnageant .... p. 11

A. Phospholipides .... p. 11

1°. Lécithine et rapport lécithine/sphingomyèline 12

2°. Test de Clements et coll. .... p. 15

B. Autres constituants .... p. 17

1°. Créatinine .... p. 17

2°. Bilirubine .... p. 18

3°. Oestriol et autres paramètres .... p. 18

III. Etude du contingent cellulaire .... p. 19

A. Cellules orangées .... p. 19

1°. Variations au cours de la grossesse .... p. 19

2°. Origine et signification .... p. 21

B. Cellules amniotiques et cellules foetales .... p. 23

C. Lipides cellulaires .... p. 27

1°. Taux et composition .... p. 27

2°. Origine .... p. 29

CHAPITRE II

ETUDE EXPERIMENTALE .... p. 31

I. Matériel et Méthodes .... p. 32

A. Réalisation du sédiment .... p. 32

B. Extraction automatique des lipides .... p. 34

C. Séparation des classes lipidiques .... p. 37

1°. Chromatographie en couche mince .... p. 37

2°. Couplage chromatographie en couche mince-pyrolyse et détection à ionisation de flamme p. 39

D. Dosage enzymatique des glycérides .... p. 44

1°. Principe .... p. 45

2°. Protocole opératoire .... p. 46

E. Dosage des protéines .... p. 52

F. Technique de prélèvement du liquide amniotique ... p. 54

G. Estimation postnatale de l'âge gestationnel ...... p. 55

II. Résultats .... p. 56

A. Variations de la composition des lipides du liquide amniotique .... p. 56

B. Glycérides cellulaires. Evolution du rapport glycérides/protéines .... p. 59

III. Discussion .... p. 70

CONCLUSIONS .... p. 75

BIBLIOGRAPHIE .... p. 77

INTRODUCTION

L'obstétricien est souvent confronté avec le problème de l'estimation de la maturité foetale. En effet dans le cas où l'interruption de grossesse est nécessaire comme dans la toxémie prééclamptique, le diabète maternel, l'incompatibilité sanguine foetomaternelle ou les dystocies, il faut estimer avec précision l'âge foetal afin d'éliminer une trop grande prématurité. Le but est en effet de soustraire à temps le foetus à un environnement devenu néfaste en évitant l'écueil de lui donner trop tôt une autonomie qu'il ne peut encore assumer. Par l'estimation de l'âge foetal, on pourra espérer réduire la lourde participation de la prématurité au taux de la mortalité périnatale : 47 % à 31 semaines, 39 % à la 33ème semaine, et seulement 7 % à 35 semaines et 2,7 % à 37 semaines (87).

Le concept d'âge foetal est assez vague et est exprimé, souvent indifféremment en âge gestationnel, en âge menstruel ou en âge foetal, qui n'ont cependant pas la même signification :

- l'âge gestationnel est compté à partir de l'implantation ovulaire.
- l'âge foetal est compté à partir de la fécondation.
- l'âge menstruel dès le premier jour des dernières règles.

Une autre notion est à préciser, celle de la durée normale de la gestation : les études ont été réalisées dans des cas où la date d'ovulation était certaine. La durée varie selon les statistiques entre 265 et 268 jours après l'ovulation, avec un écart-type de 8 à 12 jours (19, 62). Si la durée de gestation est exprimée en nombre de semaines par rapport aux dernières règles, les valeurs sont de 39,8 $\pm$ 1,7 semaines. (62).

Actuellement, on a tendance à utiliser l'âge menstruel malgré son imprécision fréquente due à de nombreux facteurs comme l'irrégularité de cycle menstruel, la méconnaissance volontaire ou involontaire de la date des dernières règles (73). De plus, la fréquence accrue de la contraception hormonale rend l'appréciation des dernières règles bien

illusoire. En effet, pour que les critères cliniques d'estimation de la maturité foetale soient utilisables, il faut que les cycles soient réguliers, la date des dernières règles certaine, et toute contraception hormonale interrompue depuis six mois (81). Une fois sur cinq, la date des dernières règles est inconnue ou douteuse (81) : les contraceptifs hormonaux modifient le cours des cycles, des hémorragies surviennent parfois un cycle après la fécondation.

Les données des examens cliniques en cours de grossesse, détection ultrasonique précoce des bruits du coeur foetal, date d'apparition des mouvements actifs puis de l'audibilité stéthacoustique des bruits du coeur foetal, hauteur utérine et palper du contenu utérin ne peuvent fournir qu'une appréciation grossière du terme (134). La mesure de la hauteur utérine est fortement influencée par les variations du volume amniotique et l'obésité. En outre, lors de diabète ou d'insuffisance placentaire où précisément il est souhaitable d'interrompre la grossesse avant le terme, l'estimation de ces paramètres est faussée.

C'est alors que les tests paracliniques de maturité foetale deviennent nécessaires ; la radiologie du squelette foetal a été proposée : degré de calcification, données mensuratrices de divers segments osseux, céphalométrie, recherche de certains points d'ossification, mais ces paramétres sont inconstants (61) et cette technique nécessite des expositions répétées du foetus aux radiations ionisantes.La mesure ultrasonique du diamètre bipariétal de la tête foetale donne une bonne estimation de la maturité par comparaison à des tables de référence donnant les dimensions du sac ovulaire et du diamètre bipariétal (82). La détermination chez 1 000 patientes (83) a montré une bonne corrélation avec l'âge gestationnel mais cette méthode nécessite un équipement complexe et un personnel bien entrainé afin de minimiser les variations d'interprétation (9, 22).

Depuis la multiplication des amniocentèses lors de la surveillance de la souffrance foetale des isoimmunisations Rhésus (144), de nombreux auteurs se sont attachés à découvrir une relation entre les composants du liquide amniotique et la maturité du foetus. Alors que la plupart des travaux ont porté sur les constituants de la phase liquide, le contingent cellulaire n'a quant à lui guère fait l'objet que d'études cytochimiques. Il nous a donc semblé intéressant de rechercher si la composition biochimique des cellules du liquide amniotique ne pouvait pas être le reflet de la maturation foetale et constituer un index utilisable en pratique clinique.

CHAPITRE I

METHODES ACTUELLES D'ESTIMATION DE LA MATURITE FOETALE PAR EXAMEN DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

I. CARACTERES GENERAUX DU LIQUIDE AMNIOTIQUE

A. Origine et circulation

1°. Origine

C'est dès le 7ème jour après la fécondation, date à laquelle la cavité amniotique s'isole dans le bouton embryonnaire, que le liquide apparait. Il a une triple origine :

. foetale, par dialyse à travers les vaisseaux du cordon, secrétion cutanée (elle commencerait au 8ème jour pour se tarir à la 20ème semaine), trachéopulmonaire, rénale enfin comme Hippocrate l'enseignait déjà à ses élèves.

. maternelle, surtout jusqu'à la 20ème semaine, date où les pertuis entre les cellules amniotiques disparaissent pour former une couche continue.

. amniotique, prouvée par la microscopie électronique qui a mis en évidence de très nombreuses villosités et canalicules amniotiques.

Des trois voies, la voie amniotique, qu'elle soit transsudative ou exsudative semble être la plus importante (3, 37).

2°. Circulation

Le liquide amniotique n'est pas une eau dormante. Sa circulation a pu être mesurée grâce aux traceurs radioactifs : la totalité du volume est renouvelée en moins de trois heures (92, 47).

La résorption est foetale, par voie digestive, cutanée, vasculaire par le cordon et amniotique par filtration sélective en direction du milieu maternel, car même le foetus mort, il persiste une circulation du liquide amniotique.

Par l'étude histologique des membranes ovulaires Smadja et coll. (128) ont montré que le processus métabolique de régulation du liquide amniotique se passe dans la totalité des membranes et tout particulièrement au niveau du cytotrophoblaste se trouvant dans le chorion bordant la cavité amniotique. La conception de diffusion, de transsudation simple à travers la membrane peu différenciée qu'est l'amnios est à abandonner. Le placenta et la membrane forment un tout où le trophoblaste joue le rôle princeps pour les échanges foetomaternels aussi bien dans la chambre intervilleuse que dans la cavité amniotique.

B. Volume et composition

1. Volume

Il varie beaucoup : de 300 ml à la 15ème semaine, à un maximum de 1 litre à la 38ème semaine, puis 800 ml à la 40ème semaine et 250 ml à la 42ème semaine (37).

2°. Composition

Il est constitué d'élèments minéraux (55) en grand nombre, d'élèments organiques (137) et de très nombreuses cellules, d'origine amniotique et foetale. Ce sont ces dernières qui ont motivé ce travail.

C. Rôle

. Nutritif car jusqu'à la constitution et le fonctionnement du placenta, tous les échanges nutritionnels se font par l'intermédiaire du liquide amniotique. Après la formation du placenta, il joue un rôle très important dans l'équilibre hydrique du foetus.

. Mécanique, permettant au foetus de se développer, de se déplacer, puis de se présenter.

. De protection contre les traumatismes extérieurs et l'infection grâce à son rôle bactériostatique.

D. Amniocentèse

L'obstacle à une étude approfondie et répétée du liquide amniotique est le fait que les amniocentèses ne sont pas dénuées de risques tels qu'hémorragies foetomaternelles aggravant l'isoimmunisation, traumatisme placentaire, blessures foetales, si cet examen n'est pas pratiqué avec de grandes précautions.

Il est tout d'abord nécessaire de bien connaître la position foetale (43) et d'éliminer l'éventualité d'une insertion placentaire basse. Le repérage aux ultrasons (35) sera préféré au repérage isotopique en raison des dangers des radiations ionisantes.

Le choix de la zone de ponction n'est pas indifférent. Pour Haworth et coll. (66) l'amniocentèse n'est pas dangereuse si la ponction est réalisée dans la zone suprapubienne. Ils rapportent une expérience de 6 000 ponctions sans ennuis graves. Ryan et coll. (118) évitent de ponctionner les zones périombilicales beaucoup plus dangereuses et rapportent 3 cas de blessures vasculaires foetales sur 291 ponctions.

Une revue génèrale de Creasman et coll. (36) fait état sur 2000 cas de 40 blessures ou hémorragies mais sans conséquences graves pour le foetus. Il apparait donc que cet examen est sûr en des mains entrainées et compétentes (50), à condition d'être effectué avec des précautions très strictes d'asepsie, en milieu chirurgical, après repérage placentaire ultrasonique dans les cas cliniques douteux, sondage vésical, en position sus pubienne, une main de l'opérateur maintenant vers le haut la tête de l'enfant, refoulant la présentation et guidant la ponction effectuée au moyen d'une aiguille à ponction lombaire.

II. ETUDE DU SURNAGEANT

Pour établir une estimation de la maturité foetale, différents éléments du surnageant du liquide amniotique ont été explorés. Les variations de leurs concentrations sont en général considérées comme le reflet de la maturation d'un organe donné : rein, foie ou poumon par exemple. Un des écueils de cette exploration réside dans le fait que sont mesurées des concentrations. Les valeurs obtenues varient donc non seulement en fonction de la quantité de la substance envisagée mais également en fonction du volume du liquide amniotique. Elles seront ainsi considérablement modifiées lors d'hydramnios ou d'oligoamnios. Un moyen d'éviter ces causes d'erreur liées à la méconnaissance des volumes exacts du liquide amniotique est d'exprimer les résultats par un rapport des concentrations de deux substances dosées dans le même prélèvement.

A. Phospholipides

En 1957, Clements (31) découvre la présence d'une substance tensioactive dans le tissu pulmonaire et en 1959 Avery et Mead (5) établissent une relation entre l'absence de cette substance tensioactive appelée surfactant et la survenue d'atélectasie pulmonaire et du syndrome des membranes hyalines. Ce surfactant qui est une substance lipidoprotidique complexe est élaboré à la jonction bronchioloalvéolaire (97), migre vers l'espace aérien et empêche l'atélectasie alvéolaire en fin d'expiration en constituant un film lipidique endoalvéolaire de tension superficielle très basse. La majeure partie des lipides de ce surfactant est constituée d'une lécithine : la dipalmitoylphosphatidylcholine (59, 97). Les chaînes aliphatiques d'acides gras constituent la partie hydrophobe de la molécule alors que le radical choline est hydrophile. Cette double affinité explique les propriétés tensioactives.

Les lécithines pures apparaissent cependant peu efficaces dans l'abaissement de la tension superficielle, mais combinées aux protéines,

elles acquiérent de remarquables propriétés tensioactives. On peut donc considérer le surfactant comme un complexe lipoprotéique contenant principalement la dipalmitoylphosphatidylcholine.

Depuis les travaux de Gluck et coll. (57) en 1967 et de Nelson (101) en 1969 les dosages des phospholipides et en particulier des lécithines ont été largement utilisés comme méthodes d'estimation de la maturité pulmonaire foetale. Il faut cependant signaler qu'il semble exister dans le liquide amniotique une source extrapulmonaire de phospholipides. Après injection de palmitate marqué au carbone ^{14}C lié à l'albumine, Condorelli et coll. (34) ont montré qu'il y avait contribution du sérum et de l'urine foetale à la constitution des phospholipides du liquide amniotique et que toutes les classes de lipides peuvent être transférées au liquide amniotique à partir de source extrapulmonaire.

Une autre approche du problème a été de suivre l'apparition du surfactant par l'étude des propriétés tensioactives du liquide amniotique.

1°. Lécithine et rapport lécithine/sphingomyéline

Selon Gluck et coll. (58) une augmentation importante de la lécithinamnie se produit à la 35ème semaine : elle semble due à la production d'une lécithine à acide palmitique, donc de même nature que celle trouvée dans le surfactant. Comme le niveau de la lécithine s'élève et que celui de la sphingomyèline semblait peu varier au cours de la gestation, les mêmes auteurs proposérent d'utiliser le rapport lécithine/sphingomyèline comme un index de maturité pulmonaire foetale. Ce rapport a l'avantage d'éliminer l'influence des variations de volume du liquide amniotique.

Schématiquement, on peut considérer que :

- pour un rapport inférieur à 0,5 il y a un très grand risque d'apparition d'un syndrome de membrane hyaline.

- pour un rapport très supérieur à 2, le risque est considéré comme nul.

- pour les valeurs intermédiaires, le risque est d'autant moins grand que le rapport se rapproche de 2. A partir de la 33ème semaine le rapport deviendrait supérieur à l'unité.

En pratique, l'établissement du rapport lécithine sur sphingomyèline se fait par lecture densitométrique des taches de lipides sur les plaques de chromatographie en couche mince de gel de silice. Or la technique densitométrique appliquée à la chromatographie en couche mince est sujette à de nombreuses erreurs incontrolées : taille du dépôt, variations dans les valeurs des Rf (rapport des distances de migration composé-éluant dans un système de partage donné), pourcentage d'humidité, technique de l'aérosol, température de migration, entre autres.

La contamination par le sang constitue une autre source d' erreurs : une étude de Verder et Clausen (139) démontre qu'un rapport lécithine sur sphingomyèline de 1,1 passe à 1,9 s'il est contaminé par 1 % de sang, à 2,2 par 1,5 %, à 2,4 par 2 %, à 3,7 par 3 %. Il faut donc être très circonspect en présence de faibles quantités de globules rouges. Le méconium, lui, va modifier l'extraction des lipides en la diminuant. La valeur de sphingomyèline a tendance à être considérée comme un étalon interne auquel on rapporte la concentration en lécithine. En fait, sa concentration varie beaucoup selon l'âge de la grossesse (56) : elle représente 38 % des phospholipides pour les grossesses de 12 à 25 semaines, 24 % pour le groupe des gestations comprises entre 26 et 33 semaines, et seulement 9 % pour les gestations comprises entre la 34ème et la 40ème semaines.

Ces variations expliqueraient la mauvaire corrélation entre la survenue de détresses respiratoires néonatales et de rapports lécithine/sphingomyèline évocateurs de maturité foetale. De plus, en raison de la faible concentration des sphingomyélines à la limite de précision des techniques utilisées, leur détermination est sujette

à d'importantes erreurs qui peuvent entraîner de grands changements du rapport lécithine/sphingomyèline.

En 1973, lors du 41ème congrès Annuel de l'Association Centrale des Obstétriciens et Gynécologues des Etats Unis, Nakamura et Roux (100) ont présenté une comparaison de tous les moyens utilisés pour l'étude de la maturation pulmonaire foetale. Il ressort de toutes ces confrontations et des commentaires de L.T. Queenan dans cette réunion, que toutes les valeurs obtenues par l'analyse du liquide amniotique sont sujettes à de grandes variations en raison de la dynamique du volume du liquide amniotique. Seul le rapport lécithine/sphingomyèline n'est pas altéré par un oligoamnios ou un hydramnios. Malgré les critiques qu'on a pu faire, ce rapport semble bien mesurer la maturation pulmonaire, moins fidèlement l'âge gestationnel. Il est capable de déterminer le point à partir duquel le syndrome de détresse respiratoire néonatale n'apparaitra pas mais est moins heureux pour la prédiction d'apparition de cette même détresse (94, 104, 115).

Depuis les travaux de Gluck et coll. (57), les publications sur ce sujet se sont multipliées (26, 28, 39, 68, 104, 120, 124, 129, 134, 135), des améliorations techniques ont été proposées (10, 20, 63, 80, 105, 120). Certains auteurs ont cherché à doser spécifiquement le surfactant par la détermination de la concentration en lécithine (104) et du rapport lécithine sur phospholipides totaux afin d'éliminer les augmentations du rapport lécithine/sphingomyèline uniquement dues à la diminution de sphingomyèline (14).

La détermination de la lécithine par chromatographie couche mince, récupération de la tache pour le dosage du phosphore sans digestion et sans interférence du gel de silice (114) serait une très bonne méthode d'estimation de maturité foetale peu soumise aux erreurs techniques (115) : une valeur supérieure à 3,5 mg de lécithine pour 100 ml de liquide amniotique correspondrait à la maturité pulmonaire (10).

Une autre approche du problème est la détermination non chromatographique des glycérophosphatides (115) qui mesure les lécithines,

les céphalines, les N-méthyl-céphalines et les acides phosphatidiques et non les sphingomyèlines qui, lors de l'hydrolyse douce réalisée dans ce dosage, sont séparées des glycérophospholipides saponifiés par les bases.

Récemment des auteurs français (1) à la recherche d'un index caractéristique du surfactant ont élaboré un dosage par chromatographie en phase gazeuse des acides gras constitutifs des lécithines : cette méthode séduisante mais longue et complexe repose sur la constatation de la relative stabilité de la concentration de l'acide stéarique et sur l'accroissement significatif de l'acide palmitique lors de la progression de la gestation. Toutefois, si l'on analyse les résultats obtenus on constate qu'un rapport de concentration en acide palmitique sur acide stéarique de 2 correspond à des grossesses allant de 29 à 35 semaines, un rapport de 4 est donné par des gestations variant de 31 à 37 semaines et un rapport de 5 peut être trouvé à des âges gestationnels compris entre 33 et 42 semaines et un rapport de 5 peut être trouvé à des âges gestationnels compris entre 33 et 42 semaines. De telles variations sont d'ailleurs retrouvées dans les études réalisées sur les rapports lécithine/sphingomyèline.

Une étude comparable (24) mesure le rapport de l'acide palmitique sur l'acide myristique. En effet, la lécithine estérifiée par deux acides gras différents, l'acide palmitique et l'acide myristique est supposée spécifique de la prématurité pulmonaire alors que la lécithine dipalmitique serait caractéristique d'un poumon mature.

2°. Test de Clements et coll.

En 1972, Clements et coll. (32) introduisent un nouveau test rapide fondé sur la capacité du liquide amniotique de former une mousse stable en présence d'éthanol ; les composés autres que les lécithines capables d'interférer sur la production de mousse (sels biliaires, sel d'acides gras libres, protéines), n'interféreraient pas étant séparées par l'éthanol.

Le test est pratiqué avec trois concentrations différentes de liquide amniotique :

- tube 1 : 1 ml de liquide amniotique
  1 ml d'éthanol
- tube 2 : 0,75 ml de liquide amniotique
  0,25 ml d'eau physiologique
- tube 3 : 0,5 ml de liquide amniotique
  0,5 ml d'eau physiologique
  1 ml d'éthanol.

Les tubes sont agités 15 secondes et 15 minutes après, s'il persiste un anneau complet de bulles à la surface du mélange, la réaction est dite positive.

Si la réaction est négative dans les trois tubes, l'âge gestationnel est inférieur à 34 semaines. Si elle est positive dans les trois tubes, aucun syndrome de détresse respiratoire néonatale ne doit survenir. Ce test apparait donc comme un moyen simple d'appréciation grossière de la maturité pulmonaire foetale et de nombreux auteurs se sont attachés à le comparer aux techniques antérieures (11, 17, 60, 115, 117). Le test de Clements et coll. (32) semble indiquer une maturité inférieure à celle déterminée par la méthode du rapport lécithine/sphingo-myéline dans 34 % des cas et supérieure dans 66 % des cas. En fait, lorsque le résultat est positif dans les trois tubes, la maturité est suffisante pour qu'aucun syndrome de détresse respiratoire néonatale ne survienne. Dans les cas douteux, réactions positives pour un ou deux tubes, il est difficile de trancher car dans 20 % de ces cas intermédiaires le foetus est immature. De plus ce test est sujet à des interférences à ne pas méconnaître, dues aux huiles silicones, antimoussants redoutables, utilisés dans les "vacutainers" et les seringues à usage unique. C'est cependant un test économique, rapide, qui a tout à fait sa place dans le dépistage de la prématurité.

B. Autres constituants

1°. Créatinine

La créatininamnie a été mise en valeur par Pitkin (111, 112) qui démontre la relation existant entre le taux amniotique de créatinine et l'âge gestationnel.

En début de grossesse les taux sont identiques dans le sang maternel et dans le liquide amniotique. Vers la 34ème semaine une augmentation brutale se produit et après la 36ème semaine le taux atteint deux fois au moins le taux sérique maternel c'est à dire 20 mg/l (41, 112). Les enfants chez qui l'on avait trouvé un taux supérieur ou égal à 20 mg/l se sont révèlés physiologiquement matures (7). Le taux moyen à terme est de 23 mg/l pour un poids foetal moyen de 3,250 kg et au dessus de 16 mg/l le foetus a 90 % de chance d'être à plus de 37 semaines d'âge gestationnel (30). Ce dosage est simple et est peu perturbé par la présence de méconium. Mais des études portant sur des séries importantes d'échantillons ont montré des valeurs trop différentes pour que l'on puisse en faire un index précis de la maturité foetale (49, 134).

L'augmentation de la créatininamnie au cours de la gestation peut être due à l'association de quatre facteurs :

. l'augmentation de la diurèse
. l'augmentation du pouvoir de concentration du rein
. l'accroissement de la masse musculaire
. la diminution du volume du liquide amniotique dans les quatre dernières semaines de grossesse.

2°. Bilirubine

La bilirubinamnie décroit de la 24ème semaine jusqu'au terme (84). Lors de l'analyse par spectrométrie du liquide amniotique à 450 nm, l'épaulement qui caractérise la présence de bilirubine disparait vers la 36ème semaine de gestation (92). En fait, ce dosage est souvent majoré par la présence de sang ou de méconium.

La conjugaison hépatique de la bilirubine serait à l'origine de cette diminution de la bilirubinamnie.

3°. Oestriol et autres paramètres

L'oestriolamnie est sujette à un facteur d'erreur important: l'émission d'urine foetale juste avant le prélèvement ce qui peut entrainer de grandes modifications du taux d'oestriol. Selon Giraud et coll. (55) un taux de 500 mg/l correspondrait à un foetus de 2500 g âgé de 36 semaines et un taux de 1000 mg/l correspondrait à un foetus de 3000 g âgé de 39 semaines. Mais des taux bas ne peuvent infirmer une maturité car ils peuvent correspondre à la souffrance d'un foetus par ailleurs mature.

D'autres paramètres ont été explorés dans le liquide amniotique. L'acide urique (18, 41, 145) donne une grande dispersion des résultats et se montre sans grand intérêt pratique.Les concentrations d' alphafoetoprotéine, glucose, électrolytes, phosphatases alcalines, urée, albumine et l'osmolalité (55, 69, 135) ne semblent pas avoir de relation bien nette avec la maturation foetale. Leur étude présente toutefois un intérêt non négligeable en pathologie (135).

III. ETUDE DU CONTINGENT CELLULAIRE

A. Cellules orangées

C'est Kittrich (78) qui en 1963 cherchant une méthode de caractérisation de la rupture des membranes par la coloration au sulfate de Bleu de Nil des cellules recueillies, met le premier en évidence des cellules colorables en orange dans le liquide amniotique. Le caractère orange de ces cellules les fit également nommer cellules graisseuses, car le Bleu de Nil colore en bleu intense les lipides à réaction acide. Les graisses neutres sont colorées en orange par le Rouge de Nil, dérivé du Bleu de Nil présent dans les préparations commerciales de ce colorant (44, 52, 88).

1°. Variations au cours de la grossesse

En 1966 Brosens et coll. (21) constatent une élévation importante du nombre de ces cellules orangées à proximité du terme. Ils précisent que cette augmentation brutale survient à la 38ème semaine. Ils affirment que ce phénomène correspond à la maturation des glandes sébacées. Pour eux un pourcentage de 50 % de cellules orangées est nécessaire pour affirmer la maturité mais de nombreux faux négatifs grèvent la portée de cet examen. Gordon et Brosens (61) confirment les travaux de Brosens et ajoutent que même lorsque le taux de cellules orangées est faible le foetus est mature s'il y a présence en grand nombre de gouttelettes lipidiques, colorées elles aussi en orange. Anderson et Griffiths (2) reculent la date d'apparition des cellules orangées à 36 semaines et insistent sur l'aspect mature d'enfants avec un compte de cellules orangées nul. De Watteville et coll. (143) confirment sans équivoque la présence fréquente de ces faux négatifs. Bishop et Corson (15) s'efforcent d'établir des formules mathématiques donnant le poids et l'âge du foetus en fonction du pourcentage de cellules orangées.

Un travail important de Sharp (124) retrouve cette augmentation rapide du contingent cellulaire orangé à la 38ème semaine et estime que dans tous les cas où le pourcentage des cellules est en désaccord avec la maturité, il y a présence importante de vernix et de gouttelettes lipidiques. Il propose alors l'idée de chercher un index lipidique par estimation biochimique qui, lui, éviterait ces faux négatifs. Sharma et Trussel (123) font part d'une opinion identique quant à l'importance pronostique de l'abondance de vernix et de gouttelettes lipidiques. Friend (51) affirme qu'avec un taux de 20 % de cellules orangées le foetus se trouve à moins de 14 jours du terme. Schumacher et coll. (122) confirment les travaux de Gordon et posent le problème des cellules très faiblement colorées en orange et des gouttelettes lipidiques qui ne peuvent entrer dans le comptage. Pelikan et coll. (110) émettent les mêmes conclusions mais ne retrouvent pas les formules de Bishop et Corson (15) beaucoup trop rigoureuses et abstraites. Sharp (124) en utilisant la coloration au sulfate de Bleu de Nil isole deux types de cellules orangées :

- les unes à contour cellulaire net et à noyau indiscernable

- les autres, polygonales à contour fragmenté et couvertes de lipides : ce sont "les cellules du vernix".

Par la suite, de nombreux auteurs (13, 22, 23, 42, 54, 66, 133, 141, 147) confirment les conclusions princeps de Brosens (21) mais sont tous frappés par l'importance des amas cellulaires difficiles à quantifier et par la présence de gouttelettes lipidiques. Selon les études récentes de Vrettos et coll. (141) si le pourcentage des cellules orangées est de 20 %, la grossesse est à 39 semaines, si le pourcentage des cellules orangées est de 30 % la grossesse est à 40 semaines au moins.

2°. Origine et signification

Depuis Kittrich (78) en 1963 et Brosens et coll. (21) en 1966, l'origine des cellules orangées était attribuée aux glandes sébacées de la peau foetale. Depuis 1970, différents travaux ont confirmé l'origine foetale de ces cellules mais n'ont pas permis de retenir une origine sébacée exclusive.

Nieland et coll. (108) lors de leurs études structurales et ultrastructurales de la peau foetale et des cellules amniotiques affirment que la cellule orangée est une cellule cornifiée foetale recouverte sur sa surface par du matériel lipidique. Le taux des cellules orangées augmente avec le terme de la grossesse et est en corrélation avec la croissance en épaisseur du stratum corneum. Ces cellules orangées ont en outre une membrane plasmique épaisse et contiennent des filaments de kératine, ce qui est caractéristique des cellules du stratum corneum.

Centène (27) dans sa thèse de médecine rapporte les faits suivants :

- les cellules orangées sont bien d'origine foetale car on ne trouve ni cellule, ni corpuscule orangés sur la face foetale de l'amnios à quelqu'âge gestationnel que ce soit.
- le stratum corneum croît beaucoup en épaisseur à l'approche du terme, ce qui correspond au remplacement des cellules desquamées en grand nombre.

Huisjes (71) rejette l'origine sébacée car il est improbable que les glandes sébacées holocrines puissent produire un tel contingent de cellules intactes. D'autre part, les frottis de peau foetale ne donnent pas un pourcentage de cellules orangées plus élevé au niveau des glandes sébacées qu'en tout autre point de revêtement cutané.

Selon Tescher et coll. (135) l'origine des cellules orangées semble épidermique, elles apparaissent à la 32ème semaine et augmentent avec l'âge de la grossesse, d'abord lentement puis subissent un accroissement net vers la 38ème semaine, coïncidant dans le temps avec la croissance en épaisseur du stratum corneum. En microscopie électronique ces cellules ont une membrane caractéristique des cellules de la couche cornée et contiennent des filaments de kératine (29, 135).

Il ressort de toutes ces données que :

- la présence de cellules orangées et leur augmentation brutale à partir de la 38ème semaine sont certaines (33).
- l'estimation du pourcentage est difficile car les classifications des types cellulaires sont nombreuses et hétérogénes.
- l'origine de ces cellules doit résider dans les glandes sébacées et la desquamation foetale.
- l'étude des cellules orangées fournit un index indépendant de la pathologie associée à la grossesse, de l'abondance du liquide, de sa couleur et constitue un test de maturité simple, assez peu précis, avec toutefois peu de risque de surestimer la maturité foetale (29).

B. Cellules amniotiques et cellules foetales

L'étude morphologique détaillée des cellules du liquide amniotique a permis de distinguer deux grandes catégories de cellules : les cellules amniotiques nucléées et les cellules foetales de desquamation épidermique, le plus souvent anucléées. La proportion des premières diminuerait avec le terme, contrairement à celle des cellules épidermiques.

Lucia Van Leeuwen et coll. (138) classent les cellules du liquide amniotique d'après leur morphologie en deux types, l'un d'origine foetale, l'autre d'origine amniotique:

- cellules foetales : polygonales ou ovoïdes, de diamètre cellulaire variant de 40 à 50 µ; le cytoplasme est sans vacuoles, transparent, prenant les colorants acidophiles ou basophiles. Un grand nombre de ces cellules sont anucléées ou avec un noyau fantôme ou picnotique ; les nucléoles sont absents et le rapport nucléoplasmique est de 1/8.
- cellules dérivant de l'amnios : ovoïdes, rondes ou cubiques, de diamètre cellulaire variant de 18 à 24 µ, à cytoplasme dense, vacuolé et généralement basophile. Le noyau est toujours bien dessiné et on trouve fréquemment un important nucléole ; le rapport nucléoplasmique est de 1/3.

Mais, l'auteur souligne la présence de nombreuses cellules dégénérées qui ne peuvent rentrer dans aucune des deux descriptions.

De façon comparable, Hoyes (70) met en évidence, d'une part un type cellulaire identique aux cellules épidermiques, mais qui dégénère rapidement, d'autre part des cellules de type macrophagique dérivant de l'épithélium amniotique qui deviennent très rares après la 32ème semaine. Pour lui, la proportion de cellules nucléées diminue avec l'âge.

Votta et coll. (140) retrouvent la diminution des cellules amniotiques après la 32ème semaine. Ils signalent par ailleurs le nombre croissant des cellules avec la progression du terme et proposent comme moyen d'appréciation de la maturité foetale le comptage de toutes les cellules mais reconnaissent l'infidélité de cette méthode.

Huisjes (72) ainsi que Parmley et Miller (109) affirment que sur le plan morphologique les cellules d'origine foetale sont identiques aux cellules kératinisées de la peau humaine et que les lipides adhèrent à la surface des cellules.

Lind (85, 86) décrit lui aussi 4 types de cellules:

- cellule nucléée, ronde avec cytoplasme dense et des contours bien définis, d'apparence identique à celle d'une cellule basale mais avec un diamètre de 10 à 15 µ.

- cellule avec des bords contournés indiquant une pression des cellules adjacentes associée à une perte d'élasticité ; le noyau est présent mais le cytoplasme est moins dense et finement granuleux ; le diamètre est de l'ordre de 20 à 25 µ.

- cellule de même taille que la précédente, mais avec un cytoplasme pauvrement coloré et agranuleux ; les contours sont irréguliers comme ceux des cellules desquamées.

- cellule desquamée anucléée dont le cytoplasme ne prend souvent pas du tout le colorant et de limites floues ; ces cellules sont parfois en amas.

Pour cet auteur, la présence de ces cellules anucléées desquamées est caractéristique d'un enfant à terme.

Erica Wachtel et coll. (78) distinguent 4 types cellulaires :

- cellule desquamée anucléée, prenant soit les colorants éosinophiles, soit cyanophiles ; ces cellules sont plus nombreuses que les cellules anucléées colorées en orange par le sulfate de Bleu de Nil.

- cellule ronde, plus petite avec un cytoplasme dense et un nucléole.

- cellule cylindrique haute,en forme de bouteille qui n'est jamais vue avant la 32ème semaine et qui serait d'origine amniotique.
éosinophil

Huisjes (71) étudie des frottis de liquide amniotique et des frottis foetaux colorés par la méthode d'Harris-Shorr et distingue 7 types cellulaires :

- cellules éosinophiles nucléées) d'origine buccale
- cellules éosinophiles anucléées)

- cellules basophiles nucléées) d'origine buccale
- cellules basophiles anucléées) et vulvaire

- petites cellules rondes, basophiles, anuclées, d'origine épithéliale urinaire.

- cellules polygonales, d'origine épidermique.

- amas basophiles provenant de cellules amniotiques en voie de dégénérescence.

Bishop et Pollock (16) se sont attachés à classer les cellules selon leur maturité et affirment que si les cellules anucléées à cytoplasme très pâle sont de l'ordre de 10 % , le foetus est âgé d'au moins 36 semaines.

Stenbäck et Ojala (130) se sont intéressés à l'histochimie et ont essayé de nombreuses colorations. C'est avec le colorant Oil Red O qu'ils trouvent une relation entre le nombre des cellules prenant ce colorant et la maturation. Ils affirment que cette augmentation à la fin de la grossesse est proportionnelle à l'âge. Pour eux, l'épithélium foetal desquame de plus en plus avec l'avancement de la gestation, alors que les membranes amniotiques desquament de moins en moins.

Vrettos et coll. (141) affirment que la présence de cellules d'origine amniotique correspond à une grossesse inférieure à 34 semaines et constatent qu'il apparait des amas cellulaires importants à partir de la 40ème semaine.

En pratique la caractérisation des différents types cellulaires se révèle difficile.Comme le souligne Lister (89) l'origine embryonnaire très proche de la peau foetale et de l'amnios explique leurs nombreux caractères communs. En effet, c'est vers le 7-8ème jour après la fécondatio que se forme la vésicule amniotique qui sépare d'une part la face dorsale du disque germinal, duquel la peau dérive, d'autre part des cellules destinées à former l'amnios.

C. Lipides cellulaires

Les cellules orangées, dont l'apparition dans le liquide amniotique constitue un index de maturité foetale sont des cellules riches en lipides comme le montre leur affinité tinctoriale. Ce fait a attiré l'attention sur les lipides du liquide amniotique et plus particulièrement sur les lipides cellulaires. L'analyse des différentes fractions du liquide amniotique a montré que la majeure partie des lipides est liée aux cellules (12, 146) ainsi qu'au vernix caseosa, mélange de sebum, cellules épithéliales desquamées et lanugo (124). L'origine de ces lipides semble bien être foetale, seul leur lieu exact d'élaboration reste quelque peu sujet à discussion.

1°. Taux et composition

Le taux des lipides totaux du liquide amniotique varie avec le terme. Pour Woyton (146), il est de 240 mg/l au premier trimestre, 710 mg/l au second et de 1150 mg/l au troisième. Nakamura et coll. (99) trouvent des taux de lipides totaux de 200 mg/l à 35 semaines et de 500 mg/l à la 40ème semaine. Selon eux, il existe une corrélation significative entre la concentration en lipides totaux et la durée de la gestation (coefficient de corrélation r : 0,58).

Des taux de 650 mg/l (52) et de 640 mg/l (dont 190 mg/l de triglycérides) (101) ont été rapportés mais sans précision quant à la période considérée. Selon Roux et coll. (116) le taux à terme est de 400 mg/l et augmenterait de façon significative à partir de la 35ème semaine. Girault et coll. (56) dans une étude récente fournissent les valeurs suivantes : 115 mg/l à 16 semaines et 222 mg/l au cours du travail avec une proportion de 80 % de lipides neutres.

Il existe également des variations qualitatives. Ainsi selon Svendsen et Grundt (132) apparaitrait après la 38ème semaine un composé possédant la même mobilité chromatographique que le squalène.

En fait, les résultats recueillis dans la littérature sont parfois discordants et difficiles à interpréter. Ceci semble principalement dû aux conditions techniques utilisées. Il n'est pas toujours précisé si l'analyse a été pratiquée sur le liquide total ou sur une de ses fractions (surnageant ou sédiment). Dans le cas où une centrifugation est effectuée les vitesses ne sont pas homogènes ni toujours connues.

Cette diversité de conditions expérimentales a d'autant plus de conséquences que les teneurs lipidiques du surnageant et du sédiment, sont très nettement différentes. Ainsi aux valeurs données par Woyton (146) pour les lipides totaux au cours de l'évolution de la grossesse, 240 mg/l, 710 mg/l et 1150 mg/l, correspondraient des taux de 110, 220 et 230 mg/l dans le surnageant. La participation cellulaire semble donc être prépondérante surtout en fin de gestation. Alors que le taux moyen des triglycérides double après la 33ème semaine, les lipides apolaires varient peu dans le surnageant (12). Cette observation expliquerait la difficulté de l'utilisation des triglycérides du surnageant comme index de la maturation foetale (56, 102).

Un sédiment obtenu par centrifugation à 4000 tours/minute pendant 15 minutes mais sans que le rayon de giration soit précisé contient 4600 mg/l de lipides dont 4180 mg/l de lipides neutres et 420 mg/l de phospholipides (56). Selon Biezenski (12), les triglycérides représentent 30 % des lipides neutres du sédiment.

Il est intéressant de constater qu'à l'étude des chiffres trouvés dans la littérature (56, 102) il apparait que les taux de lipides dosés dans le sédiment varient en sens inverse des forces de centrifugation utilisées : il semble qu'à partir d'un certain seuil, il existe une dispersion des lipides cellulaires dans le liquide total, dispersion qui diminue d'autant la concentration du sédiment. Il apparait donc que l'exploration des lipides du liquide amniotique doit se faire dans la fraction cellulaire et ce dans des conditions bien définies de sédimentation.

2°. Origine

Pritchard et coll. (113) voient dans le tissu amniotique le lieu d'élaboration des lipides car il y a similitude entre les compositions lipidiques des cellules amniotiques recouvertes de lipides, le liquide amniotique et le vernix, mais cette affirmation reste isolée.

Par contre, Woyton (146) affirme que les lipides du liquide amniotique sont produits par le stratum corneum foetal. Svendsen et Grundt (132) confirment cette suggestion en assurant que le métabolisme de la peau foetale est la source principale des graisses. On peut noter à ce propos que la peau et le liquide amniotique sont tous deux riches en triglycérides (136). De même les pourcentages des hydrocarbures constitutifs du sédiment sont très semblables à ceux de la peau (12). L'augmentation des cellules lipidiques du liquide amniotique serait liée selon Parmley et Miller (109) à l'accélération du "turn over" du stratum corneum. Cette accélération aurait pour but de préparer le foetus à la vie extra utérine, l'imperméabilité relative de la peau étant due au stratum corneum.

Pour Brosens et coll. (21) ce sont les glandes sébacées lorsqu'elles parviennent à maturité qui secrètent les lipides. Gordon et Brosens (61) tentérent d'en apporter la preuve grâce à l'analyse des lipides obtenus par le grattage de la peau foetale dans des zones riches en glandes sébacées. La même opinion est partagée par Nerdrum et Tervilä (133) pour qui la quantité croissante de lipides correspond à la maturation des glandes sébacées. Les études en microscopie électroniqu de Catherine Nessman et Françoise Baverel (107) révèlent le développement important des glandes sébacées au cours du troisième trimestre, période où le derme acquiert son aspect mature. Un argument indirect en faveur du rôle des glandes sébacées est apporté par les expériences de Kellum et coll. (77). Des glandes sébacées humaines sont prélevées sur le

scalp par des techniques de neurochirurgie et mises en incubation avec du glucose ^{14}C et des acides aminés marqués au ^{14}C dans des boîtes de Petri stériles. L'incorporation de la radioactivité est retrouvée principalement au niveau des triglycérides, fraction la plus importante des lipides du liquide amniotique.

L'origine sébacée de ces lipides est vigoureusement contestée par Huisjes (71) car, de par le caractère holocrine de ces glandes, il ne peut y avoir excrétion de cellules intactes en si grand nombre. D'autre part, la morphologie des cellules foetales riches en lipides est la même que celle des cellules épidermiques. L'hypothèse de Casaer et Akiyama (25) concilierait les deux théories : les glandes sébacées produiraient d'abord le matériel lipidique qui se mélangerait ensuite avec les débris cellulaire de la peau. Le même avis est partagé par Nieland et coll. (108) pour qui les cellules des glandes sébacées dégénéreraient et libéreraient leur contenu graisseux dans le liquide amniotique.

Quoiqu'il en soit il semble bien établi actuellement que les lipides cellulaires sont d'origine cutanée foetale. D'après les travaux expérimentaux de Biezenski (13), une origine plasmatique maternelle serait en particulier à exclure.

De plus, comme le font remarquer Biezenski et coll. (12) les lipides sont des substances insolubles dans l'eau, de poids moléculaire relativement élevé (300 à 1000), non transportées à travers le placenta et de renouvellement lent. Ils sont donc moins soumis aux phénomènes de simple diffusion à la différence de toutes les autres substances inventoriées jusqu'alors.

On peut donc espérer suivre, par l'étude des lipides cellulaires du liquide amniotique, la maturation du foetus ou du moins son développement cutané.

CHAPITRE 2

ETUDE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL ET METHODES

A. Réalisation du sédiment

Elle est apparue comme délicate. L'accélération centrifuge ne doit pas dépasser 100 g sous peine de voir les composants cellulaires se disperser dans le liquide. La sédimentation n'étant pas très intense, nous avons utilisé des tubes à fond conique de 10 ml (22 x 80mm) qui permettent de recueillir avec sureté de faibles volumes de sédiment.

Après centrifugation à 100 g pendant 20 minutes le surnageant est éliminé à l'aide d'une pipette Pasteur sur laquelle est montée une poire d'aspiration afin de bien contrôler la reprise du liquide. Sur une quantité de 10 ml on parvient ainsi à éliminer au moins 9,7 ml.

Dans 8 ml de solution saline de Hank (tableau n° 1) tiédie à 20°C, le sédiment est remis en suspension très doucement afin de ne pas séparer les lipides des surfaces cellulaires par agitation mécanique.

On centrifuge de nouveau 20 minutes à 100 g et le surnageant est éliminé pour ne laisser qu'au maximum un volume de 200 µl de sédiment lavé.

Un deuxième lavage s'est avéré inutile (le deuxième surnageant ne contient plus de lipides ni de protéines) et préjudiciable à la reproductibilité des résultats car faisant entrer de nouvelles causes d'erreurs.

Il est utile d'essuyer avec de la ouate de cellulose la face interne du tube conique afin d'éliminer les inconstants dépôts qui s'y trouvent et qui, avant l'aspiration du surnageant, flottent à la surface du liquide ainsi que l'ont constaté également Lind et coll. (42). Cette couche ne contient aucune cellule graisseuse.

HANKS'BALANCED SALT SOLUTION

Modification National Institute of Health : addition de $MgCl_2$

	mg/1	millimoles
NaCl	8000	136,8
KCl	400	5,32
$Na_2HPO_4,2H_2O$	60	0,33
KH_2PO_4	60	0,44
$MgSO_4$, $7H_2O$	100	0,41
$CaCl_2$ anhydre	140	1,26
Glucose	1000	5,55
$MgCl_2$, $6H_2O$	100	0,49
$NaHCO_3$	350	4,16

TABLEAU N° 1

B. Extraction automatique des lipides

L'extraction des lipides cellulaires a été effectuée suivant la technique de Delsal (19) avec le mélange méthylal-méthanol 4-1 (v/v).

Nous avons réalisé un montage (schéma n°1) permettant d'automatiser cette phase fastidieuse et longue de tout dosage lipidique.

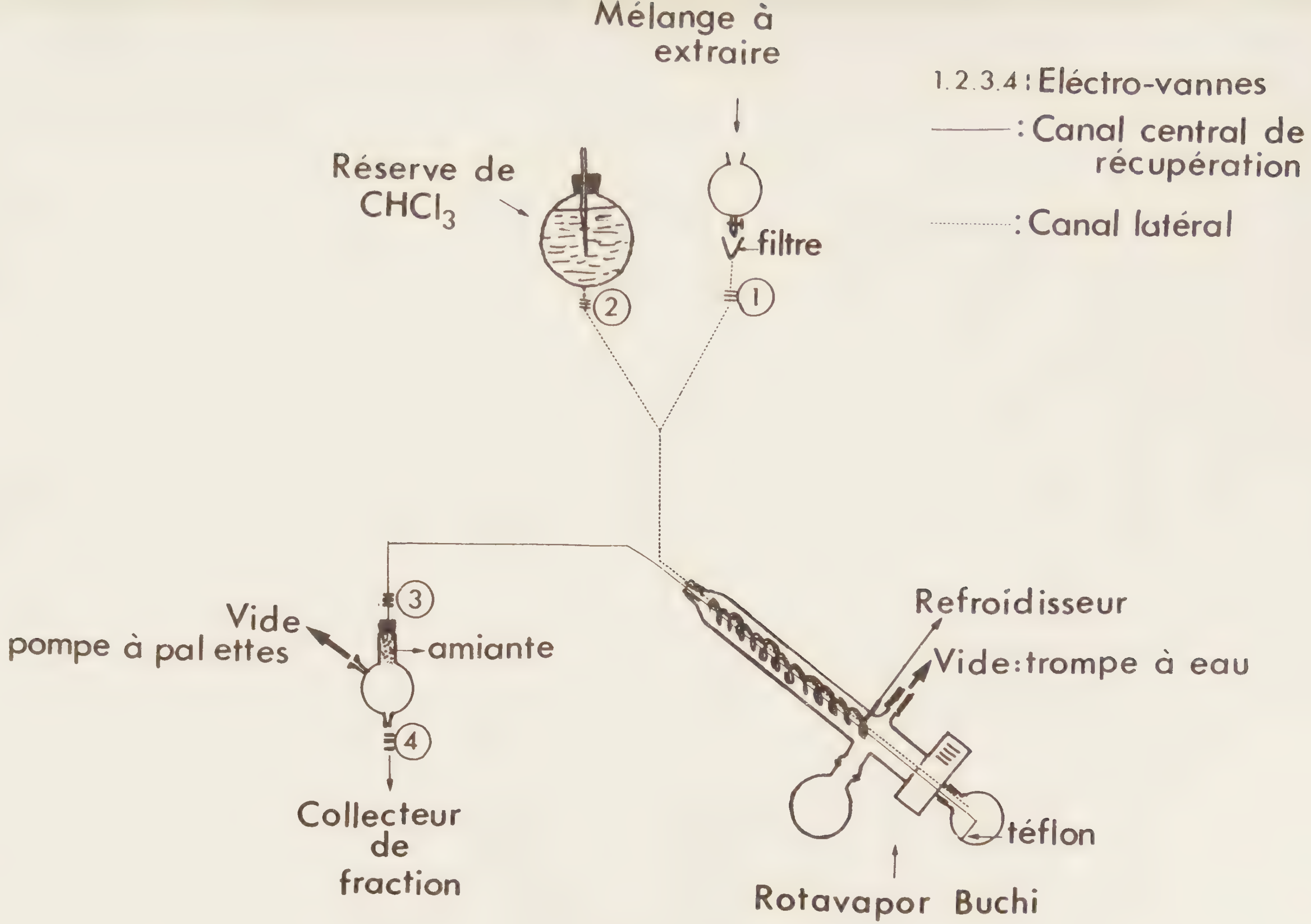
Une demande de brevet concernant ce système est en instance auprès de l'Association Nationale pour la Valorisation de la Recherche (ANVAR).

Le matériel de départ de notre système est un appareil Rotavapor Buchi auquel on couple trois canaux type "Technicon Solvaflex" :

- le premier canal apporte le mélange solvant d'extraction-composé à extraire.
- le deuxième canal est relié à une réserve de chloroforme permettant d'abord l'extraction des lipides qui ont subi préalablement une évaporation à sec, puis le lavage du système entre deux échantillons différents.
- le troisième canal est relié au tube du Rotavapor prévu à l'origine pour son alimentation et récupère l'extrait chloroformique pour le conduire à un filtre d'amiante sur lequel l'échantillon est débarassé de ses éléments minéraux. L'énergie permettant cette récupération terminale est assurée par une pompe à vide à palette "Speedivac England".

Les ouvertures et fermetures des circuits sont réalisées par des électrovannes type PA 202 NF, "Vanelec" Société Serseg, Paris, commandées par un appareillage type "Cyclic Timer", Curtiss Wright Amsterdam.

En bas d'appareillage un collecteur de fractions recueille les échantillons.



AUTOMATISATION de l'EXTRACTION LIPIDIQUE

SCHEMA n° 1

Le cycle de fonctionnement est le suivant :

- dans un premier temps undistributeur d'échantillons laisse s'écouler le mélange à extraire, l'électrovanne (1) s'ouvre, le mélange descend dans le ballon de l'évaporateur.

- dans un deuxième temps : (1) se ferme, le vide, en permanence branché sur le Rotavapor, se fait dans l'appareil, le ballon tourne, et l'évaporation du premier solvant a lieu.

- dans un troisième temps : (2) s'ouvre et laisse s'écouler une quantité de chloroforme déterminée par le temps d'ouverture de la vanne; le ballon tournant toujours l'extraction des lipides se fait totalement.

- dans un quatrième temps : (2) se ferme et (3) s'ouvre, permettant ainsi la récupération de l'extrait, la pompe à palettes étant branchée simultanément avec l'ouverture de (3).

- dans un cinquième temps : (3) se ferme, la pompe à palettes s'arrête et (4) s'ouvre, laissant s'écouler l'extrait dans le collecteur de fraction puis (4) se referme.

- dans un sixième temps : (2) s'ouvre pour laisser passer la quantité de chloroforme nécessaire au lavage de l'appareillage et le cycle reprend : (2) se ferme, (3) s'ouvre, puis se ferme, (4) s'ouvre et se referme après la collection du lavage.

Ce système permet 15 passages d'échantillons successifs sans changement de l'amiante ni du ballon du "Rotavapor". Ce changement ne sera nécessaire qu'une fois par jour.

Toute manipulation fastidieuse, dangereuse par les toxiques volatils utilisés, est évitée, ainsi que les causes d'erreurs lors de l'extraction par le chloroforme des lipides secs dans le ballon. Cette automatisation peut être étendue à l'extraction des stéroïdes en changeant les solvants.

C. Séparation des classes lipidiques

1°. Chromatographie en couche mince

Les plaques utilisées sont recouvertes d'une couche de 250 μ de gel de silice H selon Stahl (Merck). Elles sont activées 30 minutes à 120°C dans une étuve ventilée.

Deux types de solvants sont utilisés :

- pour les lipides neutres :

. éther de pétrole 40-60 (Merck)	90
. éther sulfurique (Merck)	20
. acide acétique	2
. méthanol	3

- pour les phospholipides :

. chloroforme (Merck)	65
. méthanol	25
. eau distillée	4

(les proportions sont indiquées en volume).

On dépose une quantité de lipides totaux inférieure à 2 mg à l'aide d'une microseringue Hamilton de 10 μl. La révélation se fait à l'iode resublimé (Merck).

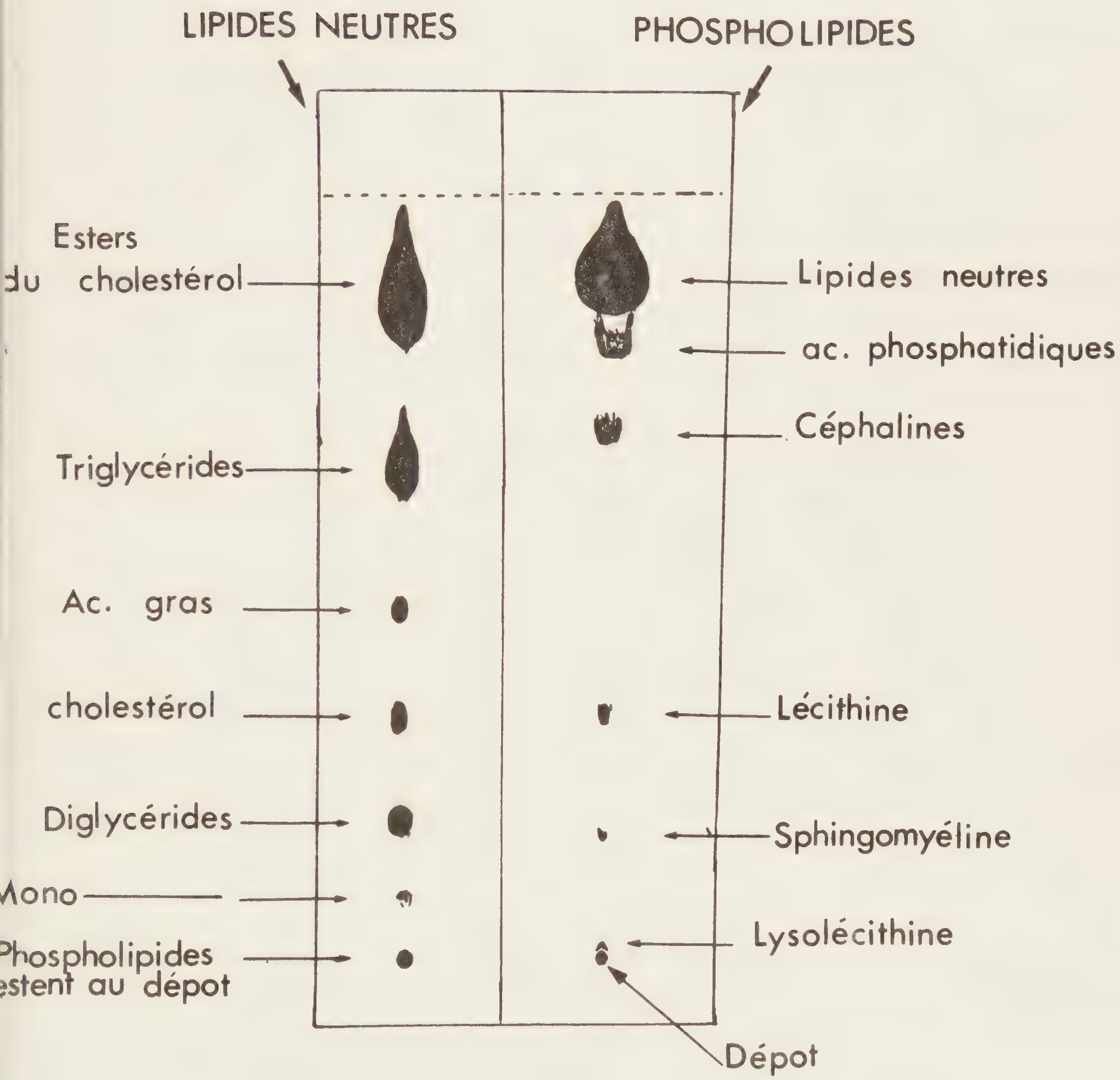
On obtient dans l'ordre croissant des Rf (schéma n° 2) :

. pour les lipides neutres : phospholipides qui ne migrent pas, monoglycérides, diglycérides, cholestérol, acides gras, triglycérides, esters du cholestérol.

. pour les phospholipides : lysolécithines, sphingomyèlines, lécithines et céphalines, acide phosphatidique, et lipides neutres au niveau du front du solvant.

Cette technique ne permet qu'une approche semiquantitative du problème même après récupération des taches, élution et pesée.

REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA SÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE



DÉPOT de 0,25 mg de lipides

SCHEMA n°2

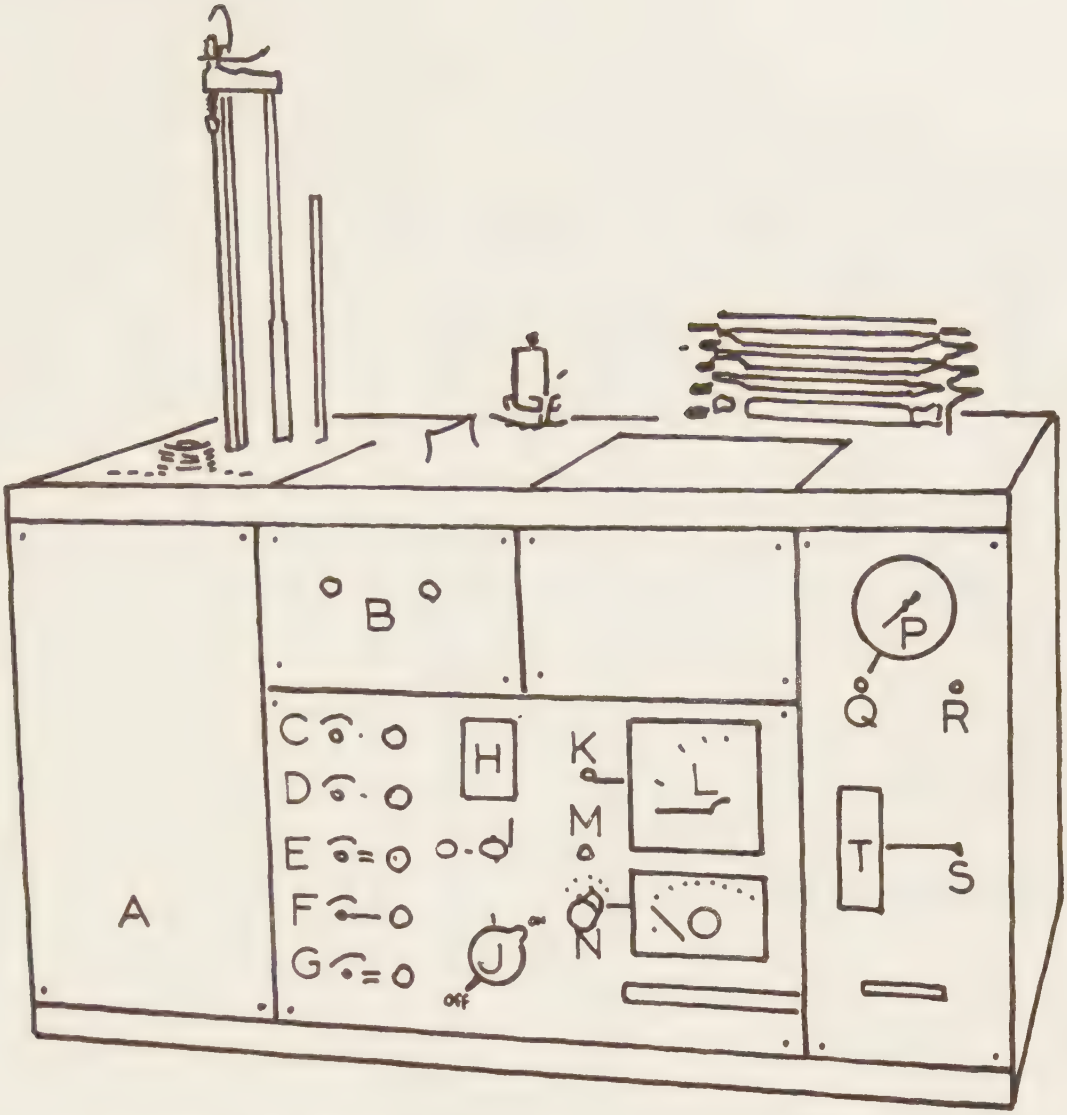
2°. Couplage chromatographie en couche mince-pyrolyse et détection à ionisation de flamme.

Nous avons eu l'occasion de tester un prototype réalisé par Becker Delft Hollande et commercialisé par Packard Instrument (schémas n° 3 et 4).

Cet appareillage reprend la technique séparative de la chromatographie couche mince : en effet, on fait le dépôt de lipides à l'intérieur d'un tube de quartz (diamètre 6 mm, longueur 210 mm) sur la paroi duquel il a été déposé une couche d'adsorbant de type comparable à celui utilisé pour la préparation des plaques de chromatographie.

Le dépôt est effectué d'une manière circulaire à l'intérieur du tube (nous avons réalisé pour ce faire un appareil permettant l'entrainement rotatoire du tube en position inclinée).Chaque tube est relié à un réservoir étanche d'éluant constitué d'un pot à scintillation dont le bouchon est percé d'un trou du diamètre du tube de quartz (6 mm) . Le microvolume du tube permet d'éviter les distorsions du front de solvant. Une fois la migration effectuée (schéma n° 5), on séche les tubes dans une étuve ventilée. Pour notre part, nous avons réalisé un appareillage dont la ventilation était assurée par la dépression créee par une trompe à vide. Ainsi nous avons supprimé toute trace d'acide acétique qui se comportait comme l'éluant le plus difficile à éliminer de la phase adsorbante.

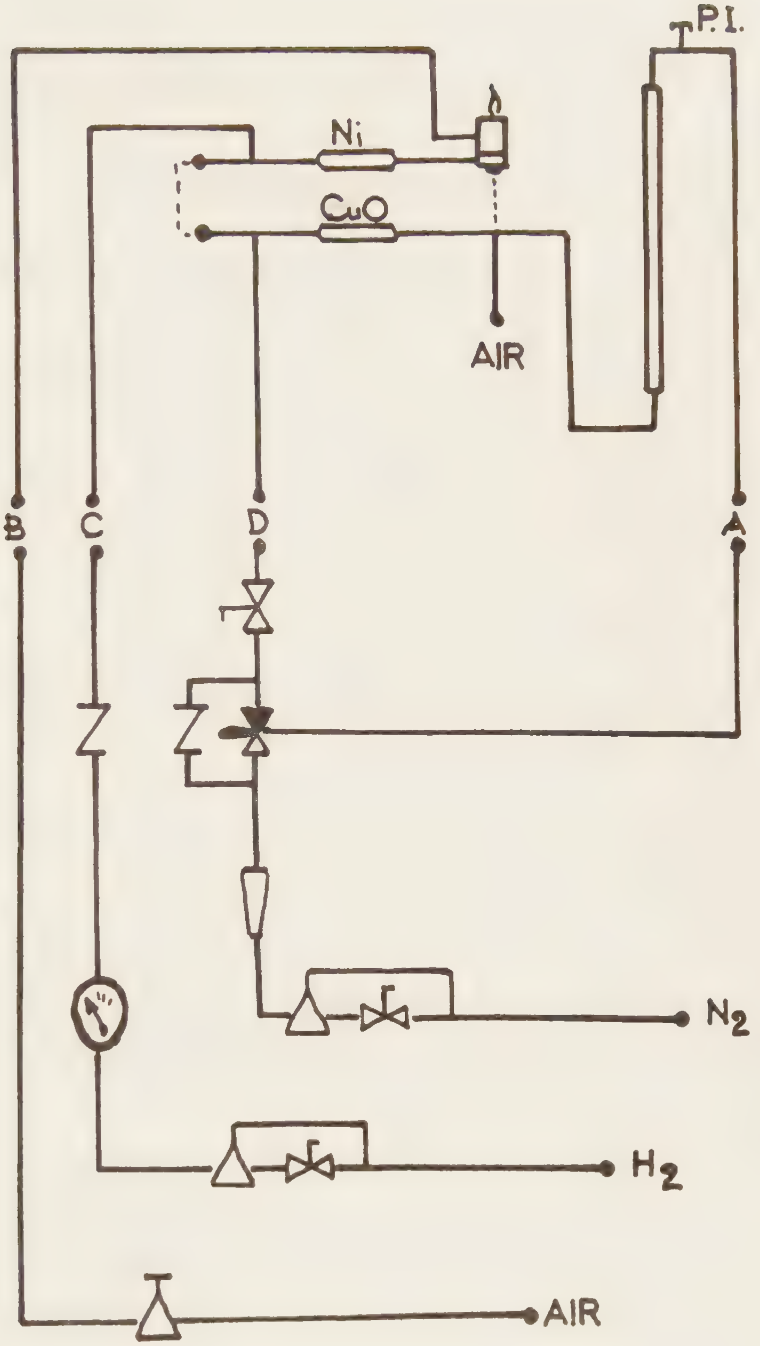
Le tube est alors prêt pour la pyrolyse. La chaleur fournie par un anneau porté à 800°C permet l'oxydation des chaines hydrocarbonnées en gaz carbonique. Le tube descend à une vitesse programmée devant cet anneau et est balayé intérieurement par un gaz vecteur (azote) qui pousse le gaz carbonique formé sur des réducteurs à base de Nickel et d'oxyde cuivreux pour le transformer en méthane. Un détecteur à ionisation de flamme est placé en fin de montage et par l'intermédiaire d'un enregistreur traduit la quantité de méthane reçue en un tracé graphique (schéma n° 6). On obtient ainsi théoriquement un dosage quantitatif par intégration des surfaces des pics.



A Schéma d'alimentation en gaz
B Connecteur capillaire entre le four à oxyde de cuivre et à nickel
C vis du potentiomètre pour ouverture du four à oxyde de cuivre
D vis du potentiomètre pour ouverture du four à nickel
E vis du potentiomètre pour ouverture du four
F vis du potentiomètre pour ouverture des vannes de commutation
G vis du potentiomètre pour ouverture du four de sèchage
H interrupteur de vitesse de descente du tube:0,5,1 et 2 cm/min
I interrupteur d'évacuation vers l'extérieur
J interrupteur d'alimentation générale
K potentiomètre de règlage d'intensité
L ampèremètre pour le règlage de l'intensité
M bouton pour la descente du tube
N interrupteur pour la lecture de la température en différents points
O lecteur de température
P manometre pour la pression d'hydrogène
O vis de règlage de la vanne d'hydrogène
R vis de règlage de la vanne d'air
S vis de règlage de la vanne d'azote
T rotamètre pour la pression d azote

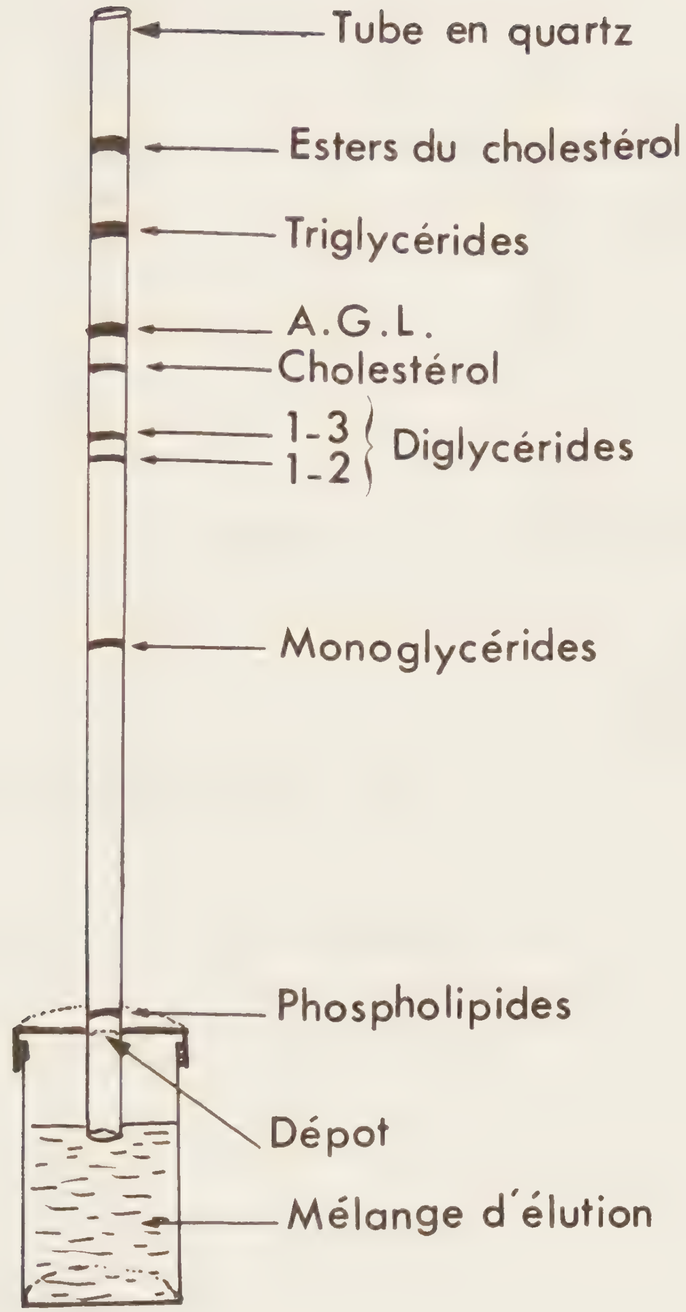
PROTOTYPE BECKER-PACKARD

SCHEMA n° 3



SCHEMA DU DETECTEUR A IONISATION DE FLAMME

SCHEMA n° 4



SÉPARATION des LIPIDES NEUTRES

SCHÉMA n° 5

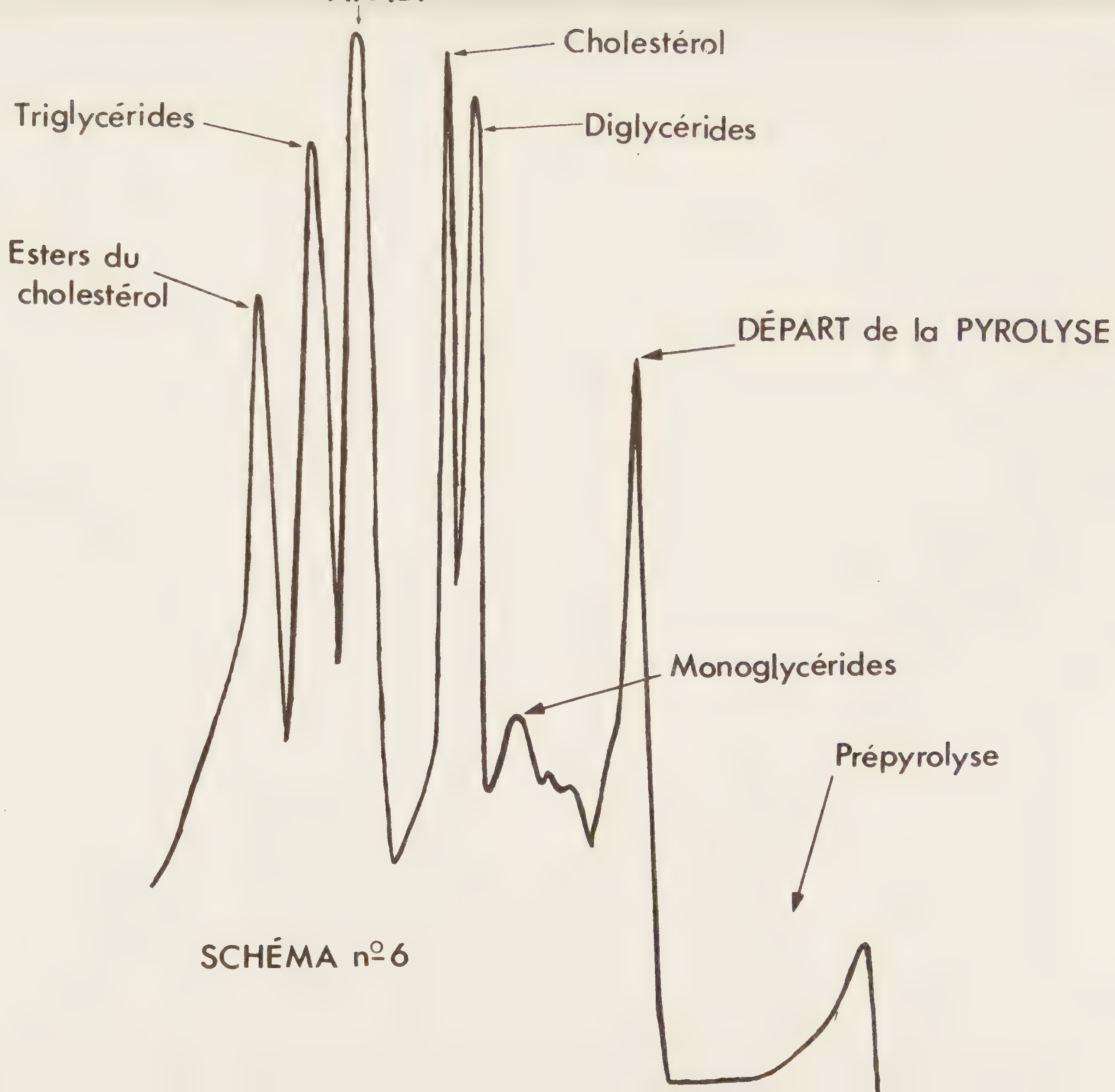

Cholestérol
Triglycérides
Diglycérides
Esters du
cholestérol
DÉPART de la PYROLYSE
Monoglycérides
Prépyrolyse

SCHÉMA n°6

La reproductibilité des résultats n'a jamais pu être obtenue car la surface de la phase stationnaire des tubes n'était pas homogène. D'autres ennuis techniques que nous ne détaillerons pas sont venus entacher ces expériences préliminaires d'erreurs dispersées qui ont conduit à abondonner cette méthode dont la mise au point s'avère laborieuse malgré l'espoir qu'elle avait suscité de permettre la quantification automatique de la chromatographie couche mince.

Toutefois une publication récente de Laatikainen et coll. (80) rapporte l'utilisation d'une telle technique pour la détermination de la lécithine du liquide amniotique.

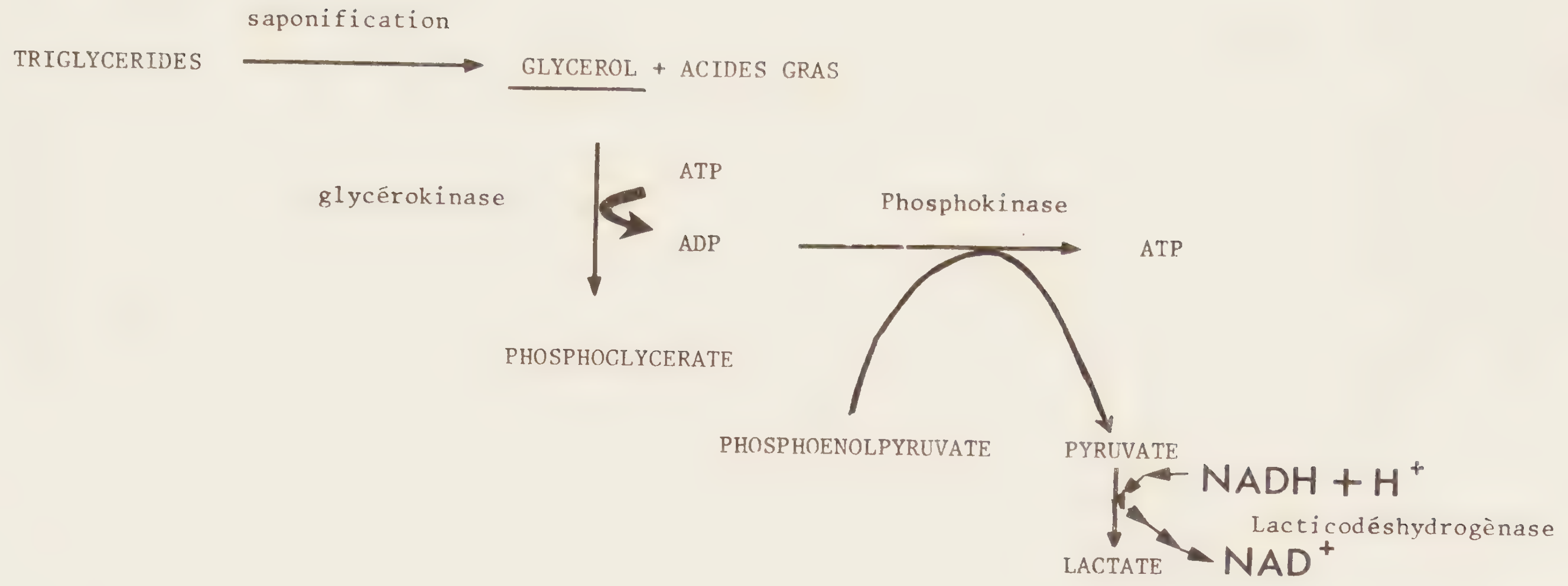
D. Dosage enzymatique des glycérides

1°. Principe

Nous avons utilisé la méthode d'Eggstein et Kreutz (45) modifiée par Schmidt et coll. (121) selon une modification personnelle du protocole préconisé par Boehringer Mannheim pour l'analyse des triglycérides sériques sur l'analyseur de taux de réaction LKB 8600 (Bromma, Suède). Le glycérol libéré par saponification des glycérides par la potasse alcoolique 0,5 N est dosé par une méthode faisant intervenir de nombreuses réactions enzymatiques en chaîne (schéma n° 7) :

- transformation du glycérol en phosphoglycérate, sous l'action de la glycérokinase en présence d'ATP qui est transformé en ADP.
- Sous l'action d'une phosphokinase l'ADP est phosphorylé en ATP, le groupement phosphate étant fourni par le phosphoénol pyruvate qui se transforme en pyruvate.
- le pyruvate est réduit en lactate en présence de lacticodeshydrogénase et de NADH + H^+ qui se transforme en NAD^+.

C'est l'oxydation de NADH qui, par la diminution de densité optique qu'elle entraîne à 340 nm, permet de mesurer quantitativement le glycérol, les réactions enzymatiques étant totales avec les concentrations utilisées (technique de saturation en enzymes).


saponification
TRIGLYCERIDES
GLYCEROL + ACIDES GRAS
glycérokinase
ATP
ADP
PHOSPHOGLYCERATE
Phosphokinase
ATP
PHOSPHOENOLPYRUVATE
PYRUVATE
NADH + H+
Lacticodéshydrogènase
LACTATE
NAD+

SCHEMA n° 7

Le mélange réactionnel comprend :

- tampon triéthanolamine 0,1 M, pH 7,6
- $MgSO_4$ 4mM
- NADH 0,24 mM
- ATP 1,03 mM
- Phosphoénolpyruvate 0,44 mM
- LDH 0,016 mg/ml
- phosphokinase, 0,008 mg/ml.

Le mélange déclenchant comprend :

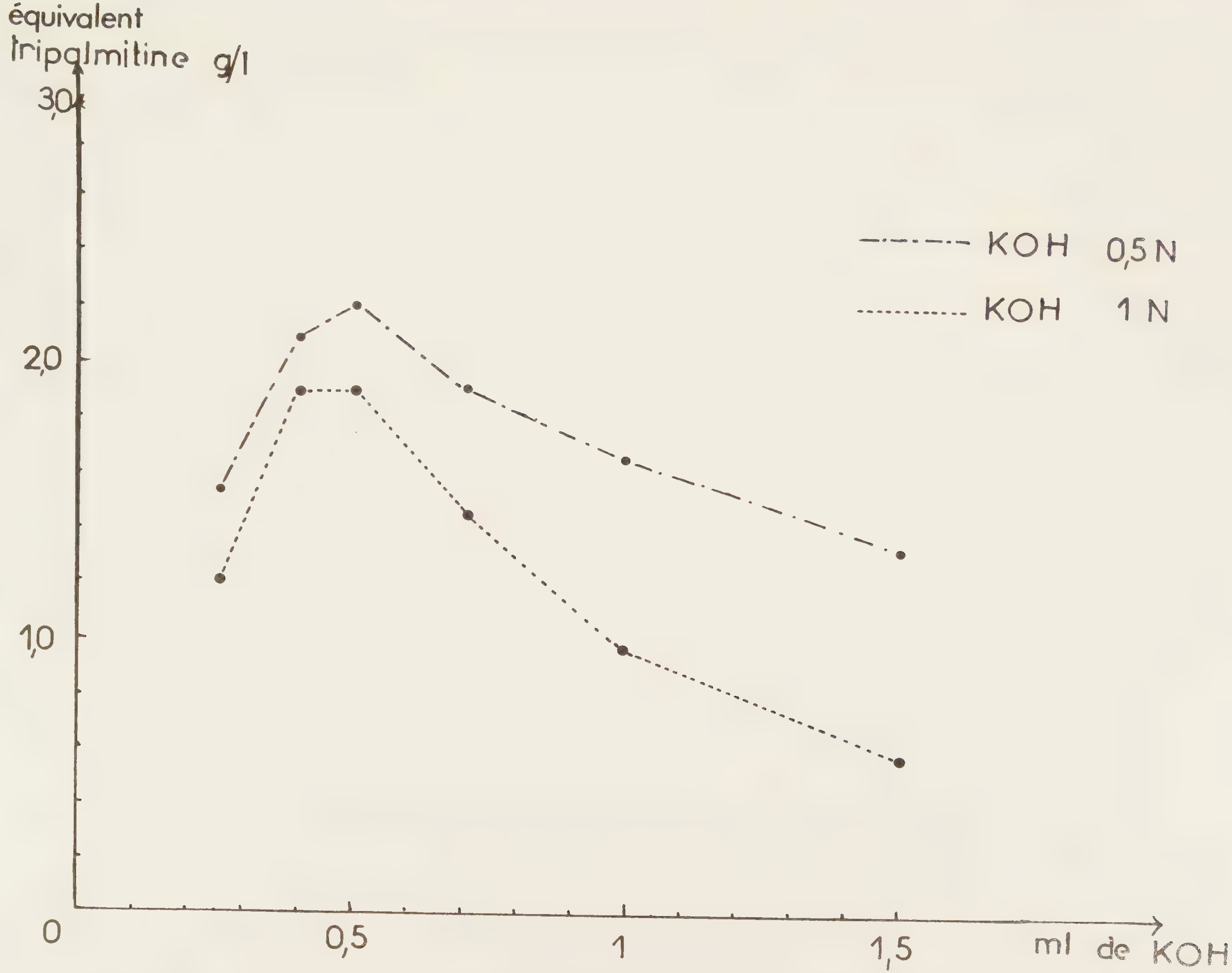
- glycérokinase 0,2 mg/ml
- $MgSO_4$ 4 mM.

2°. Protocole opératoire

Le dosage est effectué sur le culot de centrifugation qui grâce à la technique précédemment décrite contient l'ensemble des cellules du liquides amniotique. Nous ajoutons 500 microlitres de potasse alcoolique 0,5 N au culot obtenu à partir de 10 ml de liquide amniotique. C'est cette quantité qui est apparue comme donnant les meilleurs résultats. Avec une concentration plus forte (0,1 N) ou une quantité plus grande (0,7 ; 1,0 ; 1,5 ml de KOH 1,0 N), nous étions obligés, pour neutraliser les ions hydroxydes en excés, d'ajouter de grandes quantités de sulfate de magnésium (3 ml pour 1 ml de KOH 1,0 N) ce qui diluait d'autant la concentration en glycérol dans l'aliquote utilisée pour le dosage enzymatique (schéma n° 8).

D'autre part, nous avons effectué une cinétique de saponification qui nous a appris qu'après deux heures de saponification au bain de sable à 75°C celle-ci était totale (schéma n° 9).

Nous avons vérifié également que pour les concentrations en glycérol dosées, nous étions toujours en saturation d'enzyme : nous avons augmenté la concentration en glycérokinase de la solution de déclenchement et les concentrations du mélange réactionnel sans noter de modification de rendement de la réaction.



équivalent tripalmitine g/l
30
20
10
0
0,5
1
1,5
ml de KOH
KOH 0,5 N
KOH 1 N

SCHEMA n° 8

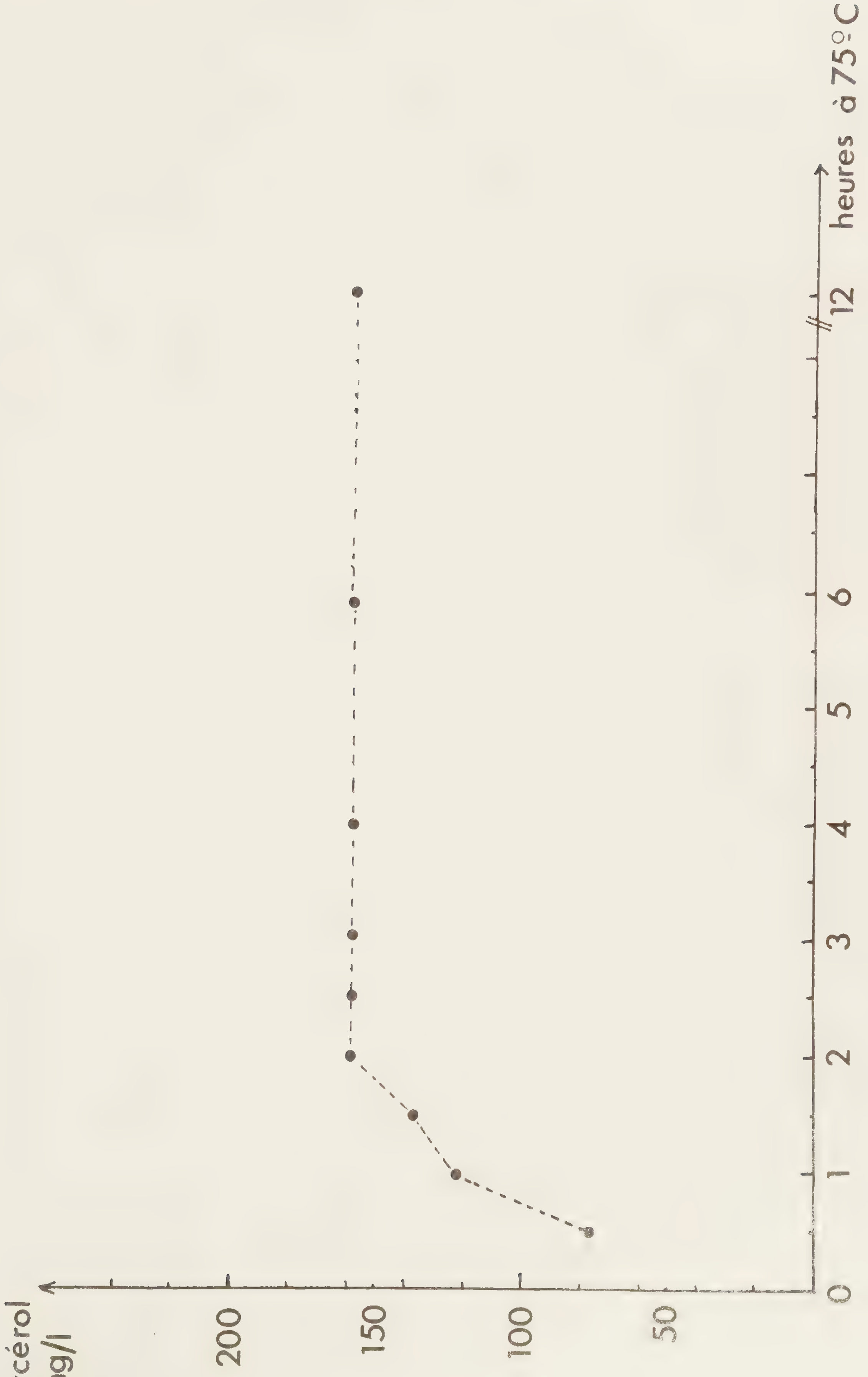


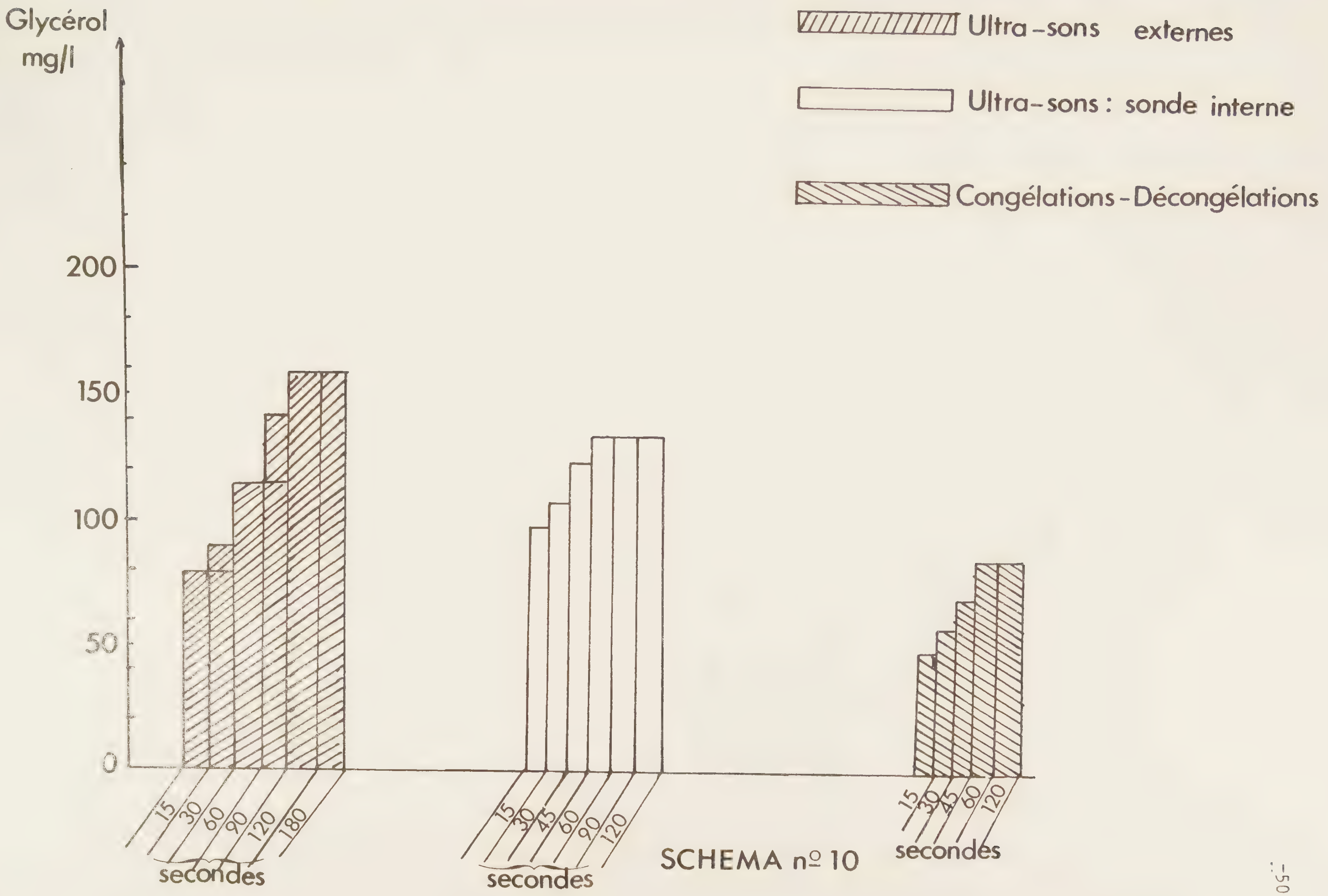
SCHÉMA n° 9

Nous avons modifié le volume de l'échantillon à doser afin d'utiliser la pleine échelle de l'appareil. Nous utilisons 100 µl du surnageant au lieu des 50 µl préconisés ; le pH du milieu réactionnel ne varie pas lors de cette modification.

Afin de doser la totalité des glycérides des cellules nous cherchons à lyser totalement ces cellules. Nous avons essayé les congélations et les décongélations successives, les ultrasons par sonde interne, puis par voie externe. Les congélations-décongélations sont fort longues et insuffisantes pour homogénéiser les suspensions cellulaires. Les résultats les plus reproductibles, complets, et adaptés au travail en série nous ont été donnés par traitement de deux minutes par les ultrasons par voie externe (schéma n° 10). Nous utilisons un appareil Ultrasonic type NSU 157 de 250 W de puissance.

Le protocole d'ensemble est donc le suivant. (Tous les volumes sont distribués à l'aide de micropipettes Eppendorf.)

- au culot lavé ajouter 500 µl de KOH alcoolique 0,5 N
- lyser les cellules par des ultrasons externes de façon à obtenir une suspension claire et homogéne : 2 minutes suffisent.
- saponifier 2 heures au bain de sable à 75°C dans un tube bien bouché (nous interposons entre le bouchon et le tube un carré de "parafilm" comme joint d'étanchéité).
- laisser refroidir et ajouter 1 ml de sulfate de magnésium 0,15M
- agiter et centrifuger à grande vitesse afin de sédimenter le précipité de $Mg(OH)_2$: le glycérol se trouve dans le surnageant, débarassé des ions hydroxydes en excés.
- dans une cuvette de mesure en polystyréne à usage unique LKB 7486 ajouter 100 µl de surnageant à 1 ml de mélange réactionnel.
- déclencher la réaction dans l'appareil LKB 8600 avec 50 µl de réactif de déclenchement. L'incubation est effectuée à 37°C pendant deux minutes.


Glycérol
mg/l
200
150
100
50
0
Ultra-sons externes
Ultra-sons : sonde interne
Congélations - Décongélations
15
30
60
90
120
180
secondes
15
30
45
60
90
120
secondes
15
30
45
60
120
secondes

SCHEMA n° 10

Pour chaque série de mesure, on interpose toujours un témoin où le culot cellulaire est remplacé par de l'eau. D'autre part, quatre dilutions du sérum de contrôle "Précilip" Boehringer Mannheim sont utilisées systématiquement afin de vérifier la linéarité de la relation variation d'extinction-concentration.

Le glycérol libre dans le culot cellulaire a été dosé. Il ne montre pas de variations importantes (± 15 %) selon les échantillons et surtout ce glycérol libre ne représente que 3 % de la valeur trouvée après saponification. Nous ne soustrayons donc pas la valeur du glycérol libre des dosages trouvés, (la variation ne peut représenter que 0,5 % de la valeur totale).

E. Dosage des protéines

Nous avons couplé au dosage des glycérides celui des protéines afin de rapporter les taux obtenus à une constante cellulaire. La méthode utilisée est celle de Lowry et coll. (48) modifiée par Hartree (31) et adaptée à nos conditions expérimentales.

Trois solutions de réactifs sont nécessaires :

- Solution A

Solution de soude 0,5 N contenant 100 g/l de Na_2CO_3 et 2 g/l de tartrate de Na et K. Sa conservation est réalisée congelée.

- Solution B :

Solution de soude 0,1 N contenant 20 g/l de tartrate double de Na et de K et 10 g/l de $CuSO_4$, $5H_2O$

- Solution C :

Réactif de Folin-Ciocalteu (Merck) dilué extemporanément au 1/10 dans l'eau distillée.

De la même façon que pour le dosage du glycérol, l'étalonnage est réalisé à partir du sérum de contrôle "Precilip".(Boehringer Mannheim). Le dosage est effectué sur le surnageant obtenu après saponification du culot cellulaire et neutralisation par le sulfate de magnésium, c'est à dire le surnageant utilisé pour le dosage du glycérol.

Le protocole de dosage est le suivant :

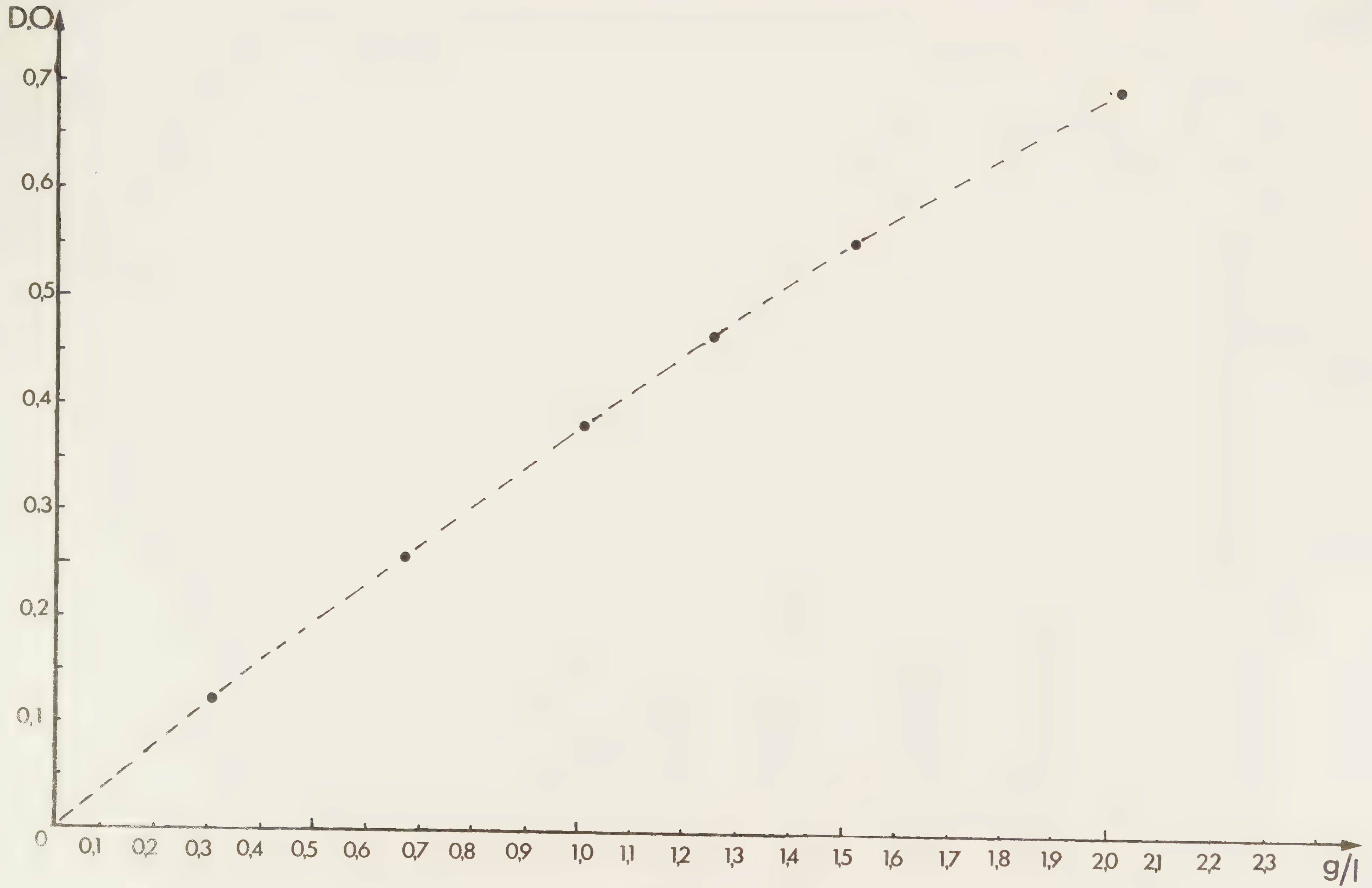
. A 1,8 ml de solution A diluée de moitié dans l'eau distillée, ajouter 100 microlitres du surnageant utilisé pour le dosage du glycérol. Mélanger, boucher et porter 10 minutes à 60°C. Refroidir en laissant les tubes 10 minutes à la température de la pièce.

. Ajouter 100 microlitres de solution B, agiter et laisser de nouveau 10 minutes à température ambiante.

. Enfin, ajouter 3 ml de solution C, bien mélanger et porter 10 minutes à 60°C.

. Laisser refroidir 10 minutes à température ambiante avant de lire au spectrophotomètre à 650 nm.

Cette méthode est reproductible et a l'avantage de montrer une relation linéaire concentration-variation de D.O. jusqu'à 0,5 unité de D.O., zone où se situent les valeurs obtenues avec les cellules du liquide amniotique (schéma n° 11).



SCHEMA n° 11

PROTEINES

F. Technique de prélévement du liquide amniotique

Trois méthodes ont été utilisées pour la collection du liquide amniotique :

. amniocentèse transabdominale après localisation placentaire par scintigraphie.

. ponction transutérine de la cavité amniotique lors de césarienne à l'aide d'une aiguille à ponction lombaire ; le mandrin n'est retiré qu'une fois l'aiguille en place.

. ponction intravaginale des membranes foetales sous contrôle visuel avec la même aiguille et avec les mêmes précautions.

Les échantillons stériles sont stockés immédiatement à + 4°C. Il est important que la température de conservation ne permette pas la congélation de l'échantillon car dans ce cas les cellules éclatent et dispersent leur contenu dans le liquide total. Une bonne conservation (2 semaines) des échantillons est possible en respectant ces conditions.

G. Estimation postnatale de l'âge gestationnel

Pour établir une corrélation entre les résultats obtenus par l'analyse du liquide amniotique et la maturation foetale, il a été nécessaire de déterminer l'âge de la grossesse.

La durée de la grossesse est pour des raisons de commodité souvent mesurée à partir du premier jour des dernières règles, ce qui donne pour une grossesse à terme une durée de 40 à 41 semaines (96). En raison de l'incertitude de cette donnée "si faussement exacte" selon S. Saint-Anne Dargassies, nous avons préféré utiliser l'estimation postnatale établie sur des critères pédiatriques de développement morphologique et neurologique.

Le poids, la taille, le périmètre céphalique n'ont de valeur que dans les cas normaux, ceux pour lesquels le parallélisme physiologique entre l'âge et la croissance physique est respecté ; ces chiffres ne reflètant que l'état nutritionnel de l'enfant seront en discordance avec l'âge vrai dans tous les cas de grossesses compliquées (119). C'est pourquoi S. Saint-Anne Dargassies a élaboré une méthode clinique d'investigation neurologique afin de donner le reflet exact de l'âge gestationnel par le degré de développement du système nerveux (119).

Cette méthode a été utilisée avec celle de Farr et Neligan (46) qui repose sur les aspects morphologiques de l'enfant : texture, couleur et opacité de la peau, présence ou non de lanugo, dureté du crâne, fermeté et forme de l'oreille, aspect des organes génitaux, taille du sein, formation du mamelon et état des dermoglyphes plantaires. Mais même en utilisant l'association de ces critères il ne sera pas possible d'estimer l'âge gestationnel à moins d'une semaine près.

(Nous remercions Madame le Docteur Y. Michiels qui a pratiqué l'examen des enfants entrant dans le cadre de notre étude).

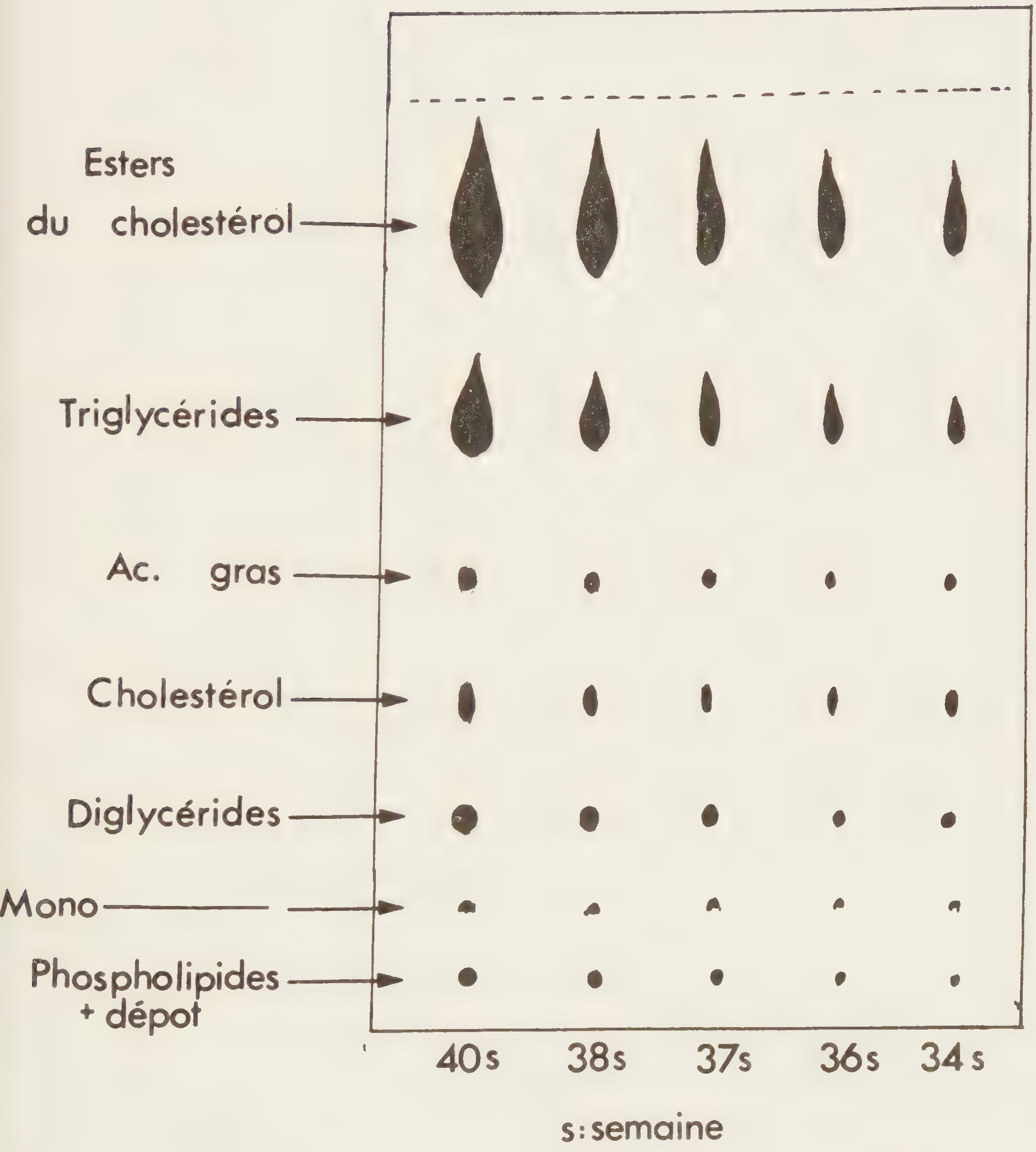
II. RESULTATS

A. Variations de la composition des lipides du liquide amniotique

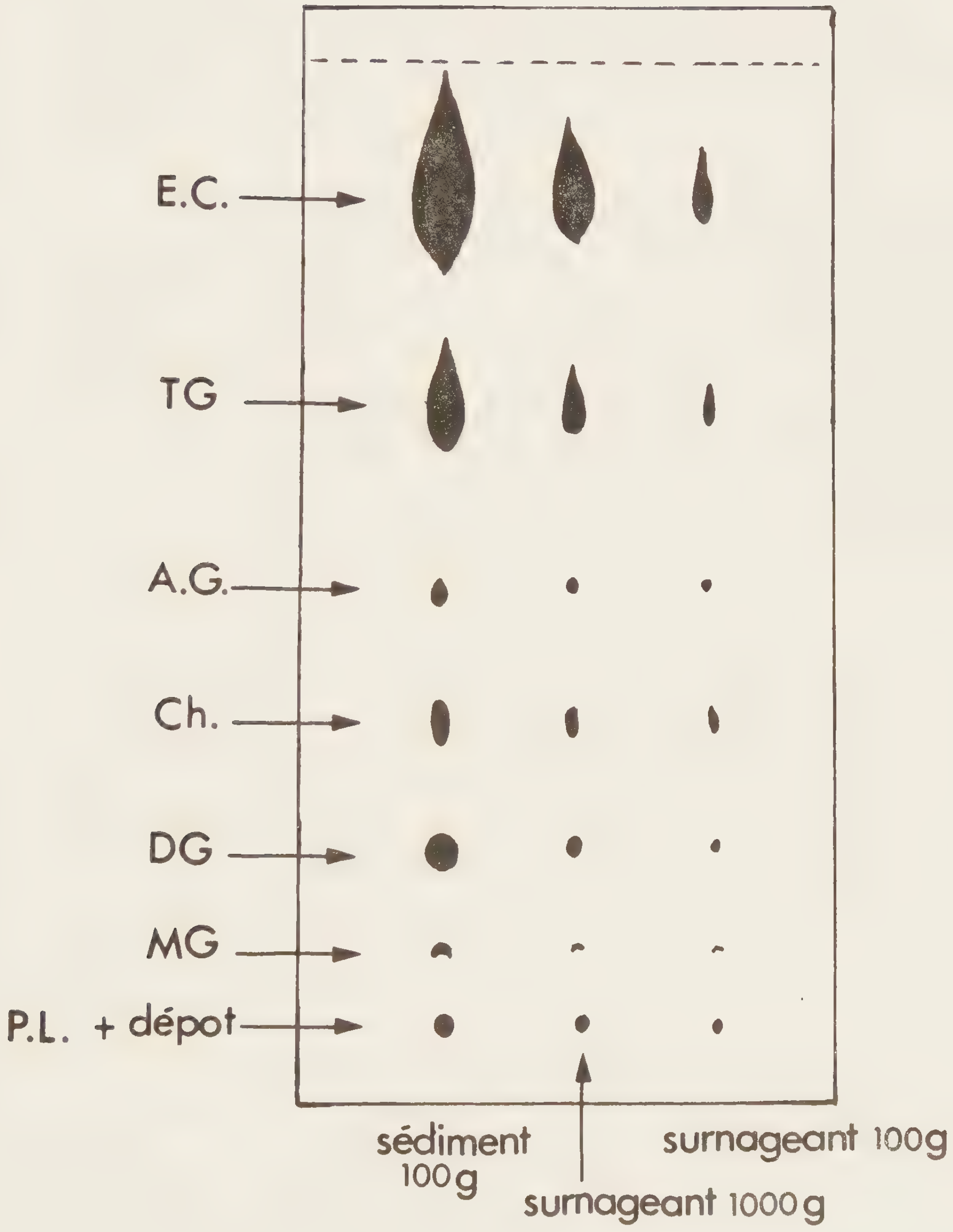
Une analyse systématique des composants lipidiques du liquide amniotique a été effectuée par chromatographie en couche mince après extraction sélective. L'étude du liquide total a permis de déceler une augmentation des lipides apolaires, triglycérides et esters du cholestérol, qui semblait en rapport avec la progression de la grossesse.

Une étude comparative a alors été réalisée d'une part sur le sédiment et d'autre part sur le liquide amniotique séparé des cellules. Les variations décelées sur le liquide total n'ont pas été retrouvées sur le liquide dépourvu de cellules. Par contre, le sédiment présentait une augmentation des lipides au cours du développement de la gestation, augmentation portant surtout sur les esters du cholestérol et les triglycérides (schéma n° 12).

La manière d'obtenir le sédiment est importante. Un seuil limite de centrifugation est fondamental ; en effet, dès que l'on dépasse 100 g, les cellules se désagrégent et l'on disperse dans le liquide total les composés lipidiques qui ne sont qu'adsorbés sur les membranes (55). Le schéma n° 13 présente les résultats obtenus avec un sédiment préparé à 100 g, le surnageant correspondant et un surnageant préparé à 1000 g. Le surnageant 1000 g est manifestement plus riche en lipides que le surnageant obtenu à basse vitesse. On peut remarquer que ce seuil de 100 g correspond à la limite supérieure des vitesses utilisées pour la sédimentation des cellules préparées par trypsination selon la méthode classiquement utilisée en cytoculture. Il n'a pas été possible de préciser de façon quantitative les variations ainsi décelées par la chromatographie en couche mince. Le dosage par pesée des lipides extraits des taches chromatographiques est en effet sujet à trop d'erreurs dans les zones de concentration où l'on est amené à travailler.


Esters
du cholestérol
Triglycérides
Ac. gras
Cholestérol
Diglycérides
Mono
Phospholipides
+ dépot
40s
38s
37s
36s
34 s
s: semaine

SCHEMA n° 12


E.C.
TG
A.G.
Ch.
DG
MG
P.L. + dépot
sédiment 100g
surnageant 1000g
surnageant 100g

SCHEMA n° 13

B. Glycérides cellulaires. Evolution du rapport glycérides/protéines

Les constatations faites au cours de l'étude chromatographique conformes aux données de la littérature ont attiré notre attention sur l'importance quantitative des triglycérides dans le contingent cellulaire du liquide amniotique et sur leurs variations au cours de la grossesse. Nous avons donc cherché s'il existait une relation simple et utilisable en clinique entre concentration cellulaire en glycérides et maturation foetale.

Puisque nous voulions mesurer une concentration cellulaire il était nécessaire de rapporter les résultats obtenus soit à un volume constant de cellules soit à un composant cellulaire de référence. La richesse cellulaire du liquide amniotique est inconstante en raison d'une part des variations physiologiques et pathologiques du volume total du liquide amniotique et d'autre part de la variation de l'intensité de la desquamation. De ce fait, les culots cellulaires obtenus à partir de volumes égaux de liquide amniotique ne sont pas comparables.

Par ailleurs il est techniquement très difficile de déterminer une quantité précise de cellules. Le volume ainsi que la masse des cellules sont sujets à de grandes variations en fonction des conditions expérimentales, du degré d'hydratation en particulier. Nous avons donc choisi de rapporter nos résultats à un constituant cellulaire considéré comme constant : les protéines. Le rapport glycérides/protéines ainsi obtenu est donc une façon d'exprimer la teneur cellulaire en glycérides.

Il existe deux causes principales d'erreurs dans la réalisation du dosage des glycérides : la présence de méconium et celle de sang. Le lavage du culot cellulaire avec la solution de Hank permet d'utiliser les liquides amniotiques teintés dans lesquels la libération de méconium est récente. Il semble que si cette libération est survenue dans les 24 heures précédant la ponction, le lavage avec la solution de Hank permette d'éliminer de la surface des cellules les pigments méconiaux qui s'y étaient adsorbés ; on constate alors que le sédiment retrouve son aspect blanchâtre habituel. Si la libération de méconium

est ancienne, les pigments sont fortement fixés sur les membranes cellulaires et le lavage à la solution de Hank ne permet pas de les libérer. Cette constatation est en cours de vérification expérimentale car elle ouvre la porte à la datation de la libération méconiale, donc à celle de la souffrance foetale en l'absence d'amnioscopies itératives. En pratique, les culots cellulaires qui restent colorés après lavage conduisent à des résultats anormalement bas. Il est permis de supposer que les sels biliaires contenus dans le méconium interviennent pour libérer les lipides adsorbés sur les membranes cellulaires et ainsi diminuent la concentration cellulaire en lipides. La possibilité de réaliser un dosage dans les liquides méconiaux est de grande importance pratique car parmi les grossesses prolongées 9 % ont un liquide teinté (4) et jusqu'alors aucun dosage d'estimation de maturation foetale n'était réalisable.

Nous avons également recherché l'influence sur nos dosages de la contamination sanguine, toujours possible lors de la ponction. La concentration protéique du globule rouge est beaucoup plus grande que celle des cellules desquamées amniotiques. Dans nos conditions expérimentales, le rapport glycérides saponifiables sur protéines dans les globules rouges est d'environ 0,001. Des épreuves de surcharge nous ont montré que l'influence de la contamination sanguine était négligeable jusqu'à une valeur de 0,1 % en volume. Ce pourcentage correspond à un liquide légèrement rosé et à une proportion d'hématies dans le culot cellulaire d'environ 5 %. Au delà, la présence de sang entraîne une diminution du rapport glycérides/protéines comme le montre le tableau ci-dessous.

Pourcentage de sang dans le liquide amniotique (en volume)	Rapport glycérides/protéines
0	0,179
0,05	0,178
0,1	0,160
0,2	0,103
0,5	0,059

La contamination sanguine des liquides amniotiques pourrait être appréciée par dosage spectrophotométrique de l'hémoglobine dans des échantillons souillés. Un tel dosage est en cours d'élaboration mais se heurte à la turbidité des liquides amniotiques.

Les variations de composition du surnageant pourraient être un facteur d'erreur dans l'analyse de la composition du sédiment. Ainsi dans les cas de toxémie gravidique d'hydramnios et d'incomptabilité foetomaternelle, les concentrations protéiques et lipidiques subissent d'importantes modifications dans le surnageant (7, 30, 32, 71). En fait le lavage que nous utilisons dans notre protocole permet d'éliminer ces causes éventuelles d'erreurs.

Après avoir mis au point le protocole expérimental sur plusieurs centaines d'échantillons, nous avons fait une étude systèmatique du rapport glycérides/protéines sur 112 échantillons de liquide amniotique prélevés à des âges gestationnels différents et au cours de grossesses normales ou compliquées. Pour chaque cas étudié, l'âge de la gestation au moment de la ponction a été déterminé rétrospectivement selon les critères pédiatriques à la naissance. Les échantillons testés correspondent tous à des dossiers cliniques complets. Ont été éliminés tous les cas où l'âge pédiatrique n'a pu être déterminé et tous les échantillons dont la qualité ne permettait pas un dosage dans les meilleures conditions. Les déterminations ont été effectuées sans connaissance du terme présumé.

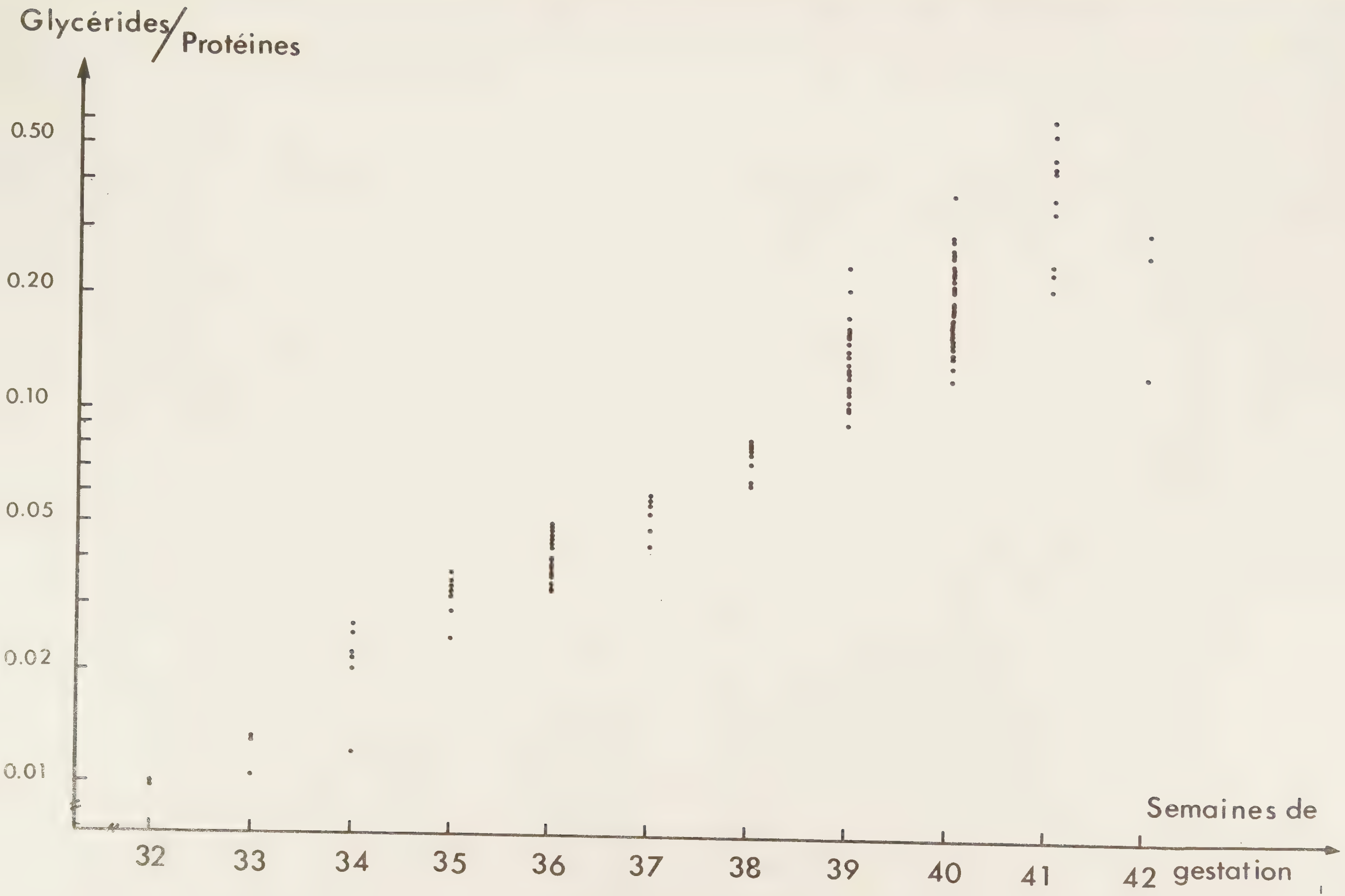
La répartition des échantillons étudiés est la suivante :

- 62 échantillons provenant de grossesses normales
- 20 échantillons provenant de femmes prédiabétiques
- 9 échantillons provenant de femmes diabétiques
- 11 échantillons provenant d'isoimmunisations Rhésus
- 9 échantillons provenant d'hydramnios
- 1 échantillon provenant d'une grossesse avec hématome rétroplacentaire.

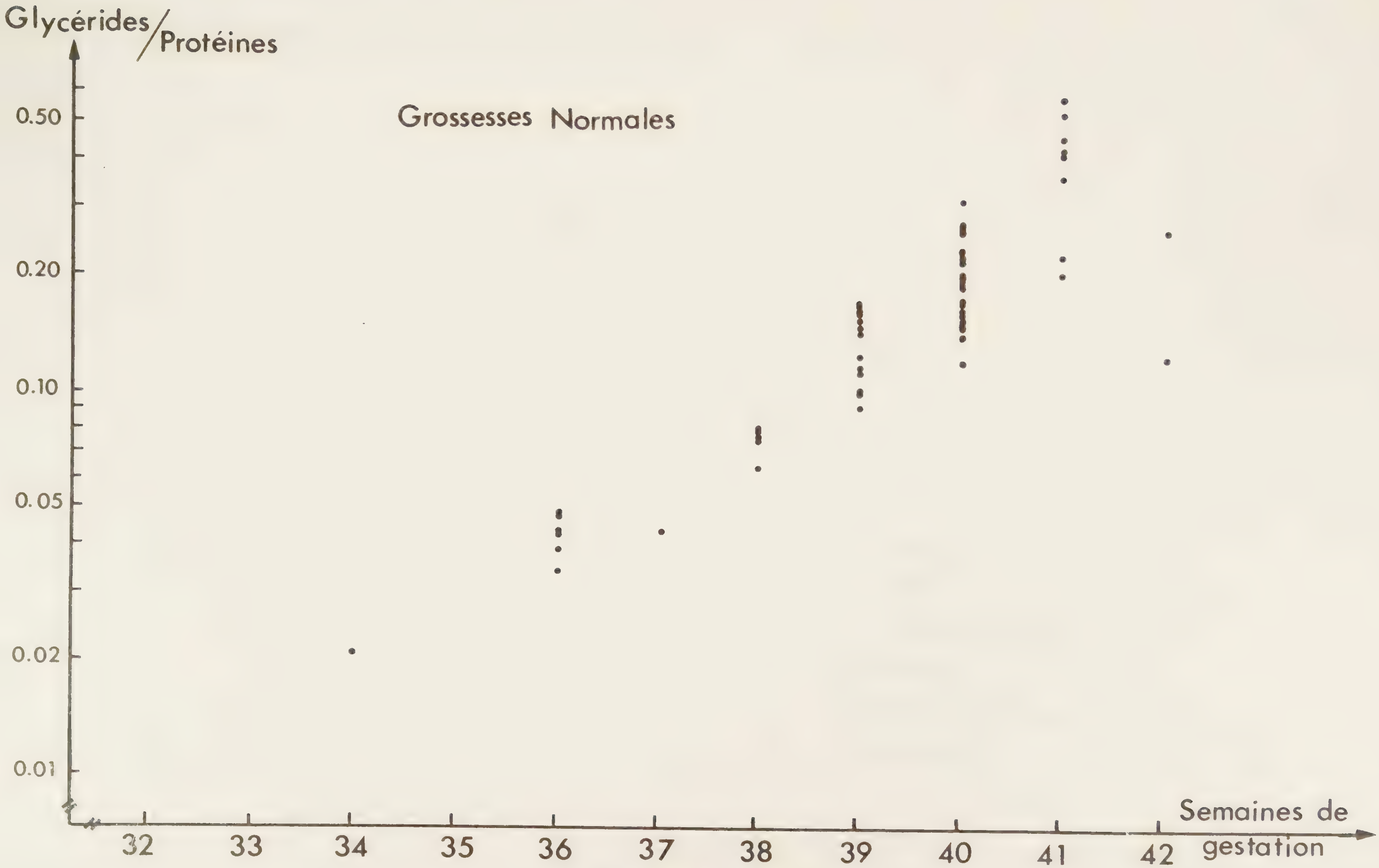
Les valeurs obtenues pour le rapport glycérides/protéines (les deux composants étant exprimés dans les mêmes unités) croissent régulièrement d'une moyenne de 0,022 à 34 semaines jusqu'à une valeur moyenne de 0,220 à 40 semaines. L'ensemble des résultats obtenus est résumé dans le tableau ci-dessous.

Age gestationnel (semaines)	Nombre de cas	Moyenne	Valeurs extrêmes inférieures	Valeurs extrêmes supérieure
25	1	0,005	-	-
31	1	0,010	-	-
32	2	0,011	-	-
33	3	0,012	-	-
34	6	0,022	0,012	0,028
35	7	0,033	0,024	0,038
36	15	0,043	0,034	0,049
37	6	0,054	0,044	0,061
38	7	0,076	0,065	0,083
39	21	0,149	0,093	0,270
40	30	0,220	0,128	0,400
41	10	0,395	0,210	0,600
42	3	0,235	-	-

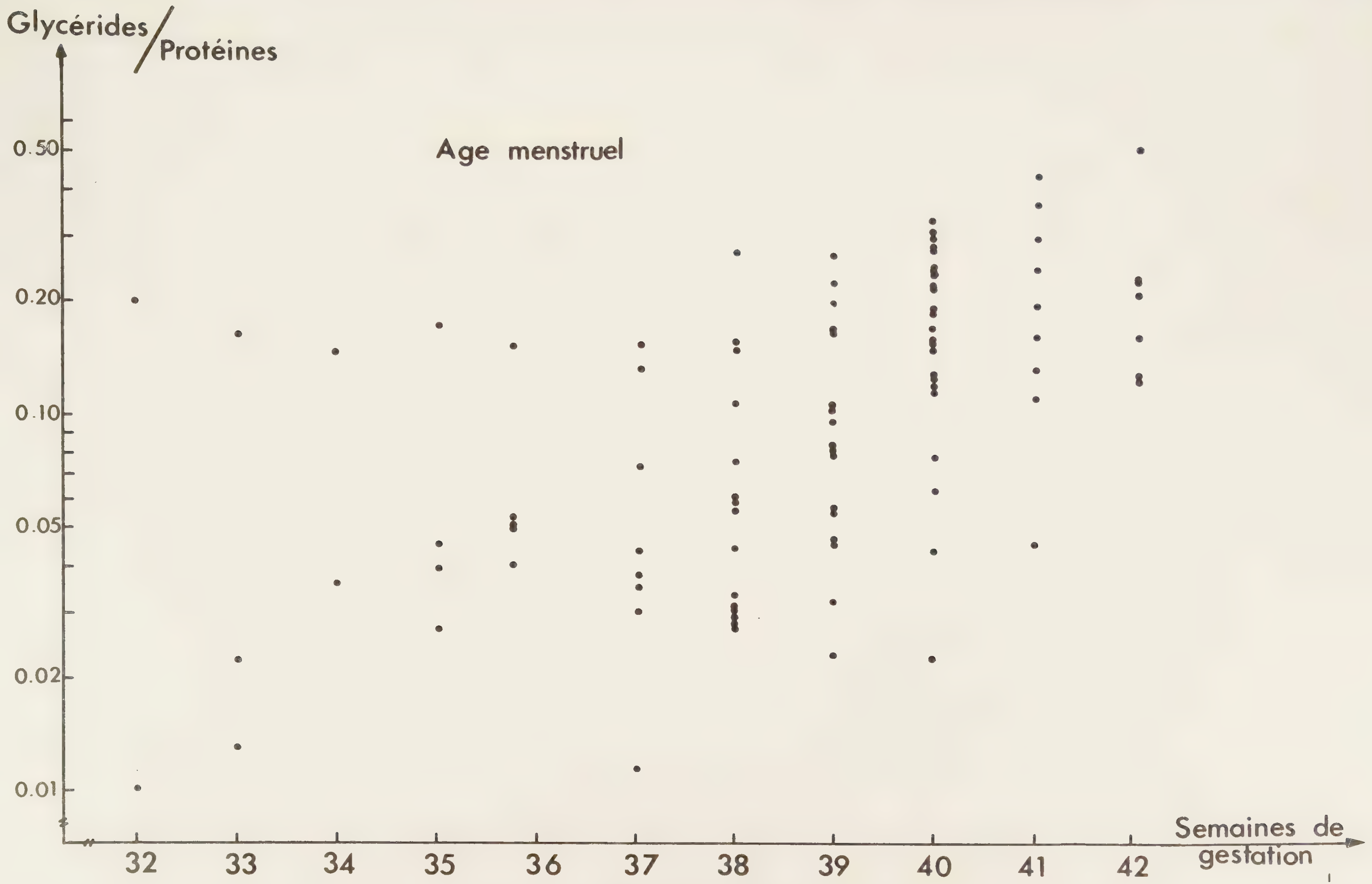
L'examen de ce tableau montre qu'il existe des variations notables du rapport d'une semaine à l'autre. Il y a peu de chevauchement des valeurs extrêmes à une semaine d'intervalle et pratiquement aucun chevauchement à deux semaines d'intervalle. Rappelons à ce propos que l'âge gestationnel auquel les valeurs sont rapportées n'a pu être déterminé qu'avec un intervalle de confiance de plus ou moins une semaine. On remarque que le rapport atteint un maximum à 41 semaines et que dans le cas de termes dépassés vrais (42 semaines) le rapport semble décroître. Le petit nombre de cas de cette dernière catégorie ne permet pas cependant de conclure d'une façon certaine. La corrélation entre le rapport glycérides/protéines et l'âge gestationnel est mise en évidence par le schéma n° 14 où les valeurs du rapport sont portées en


Glycérides/Protéines
0.50
0.20
0.10
0.05
0.02
0.01
Semaines de gestation
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

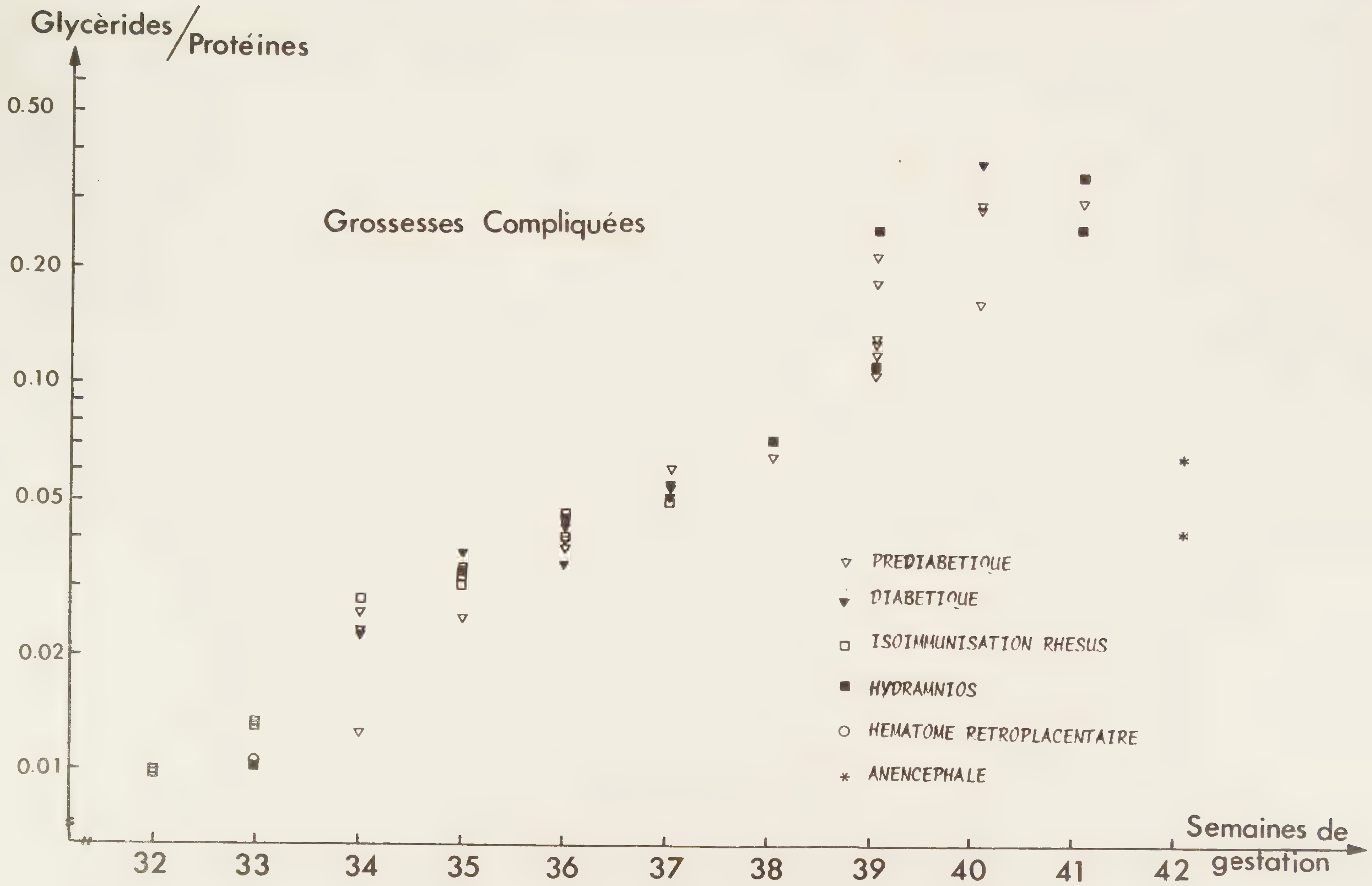
SCHEMA n°14


Glycérides/Protéines
Grossesses Normales
0.50
0.20
0.10
0.05
0.02
0.01
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
Semaines de gestation

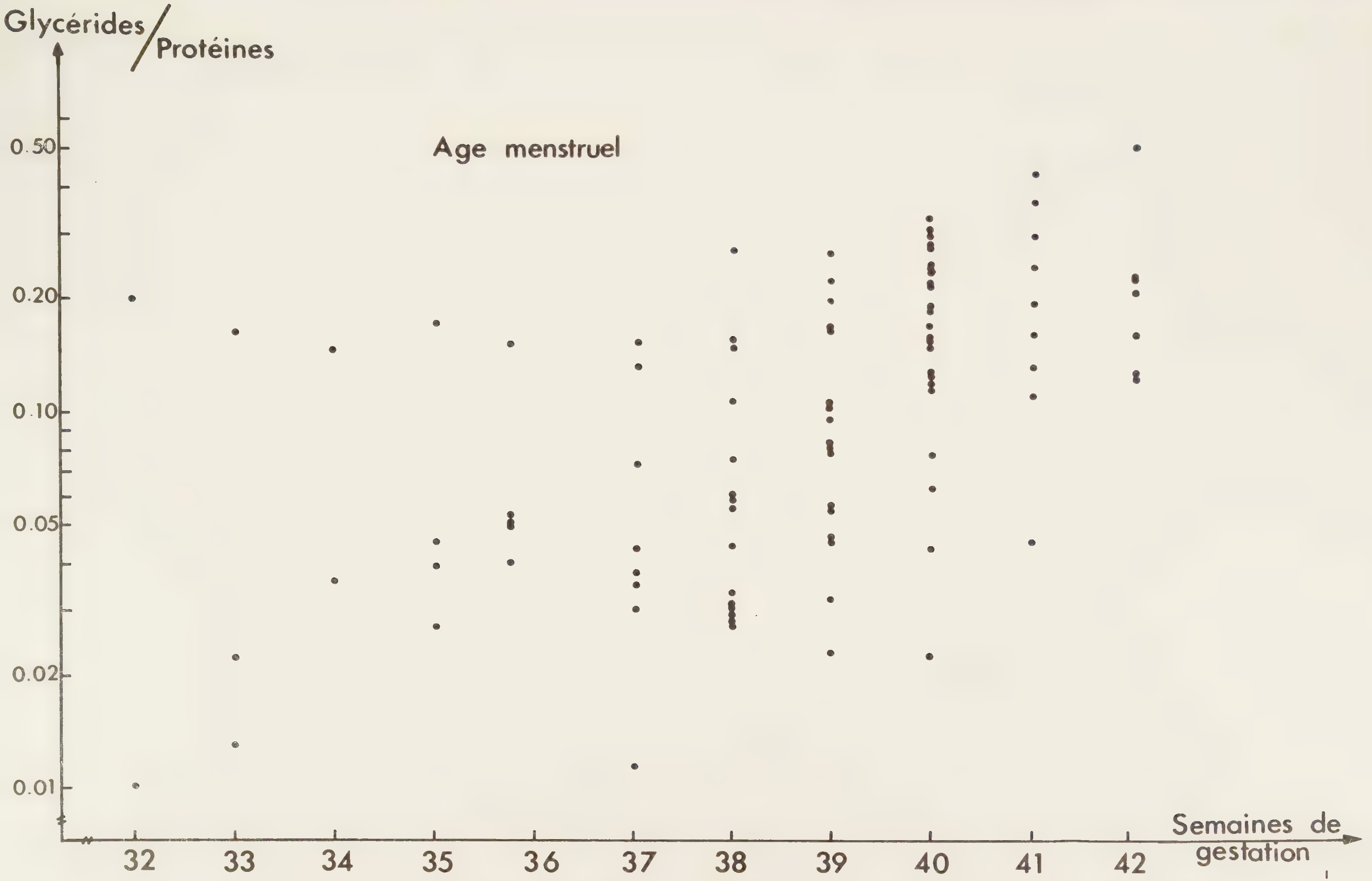
SCHEMA n° 15


Glycérides/Protéines
0.50
0.20
0.10
0.05
0.02
0.01
Age menstruel
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
Semaines de gestation

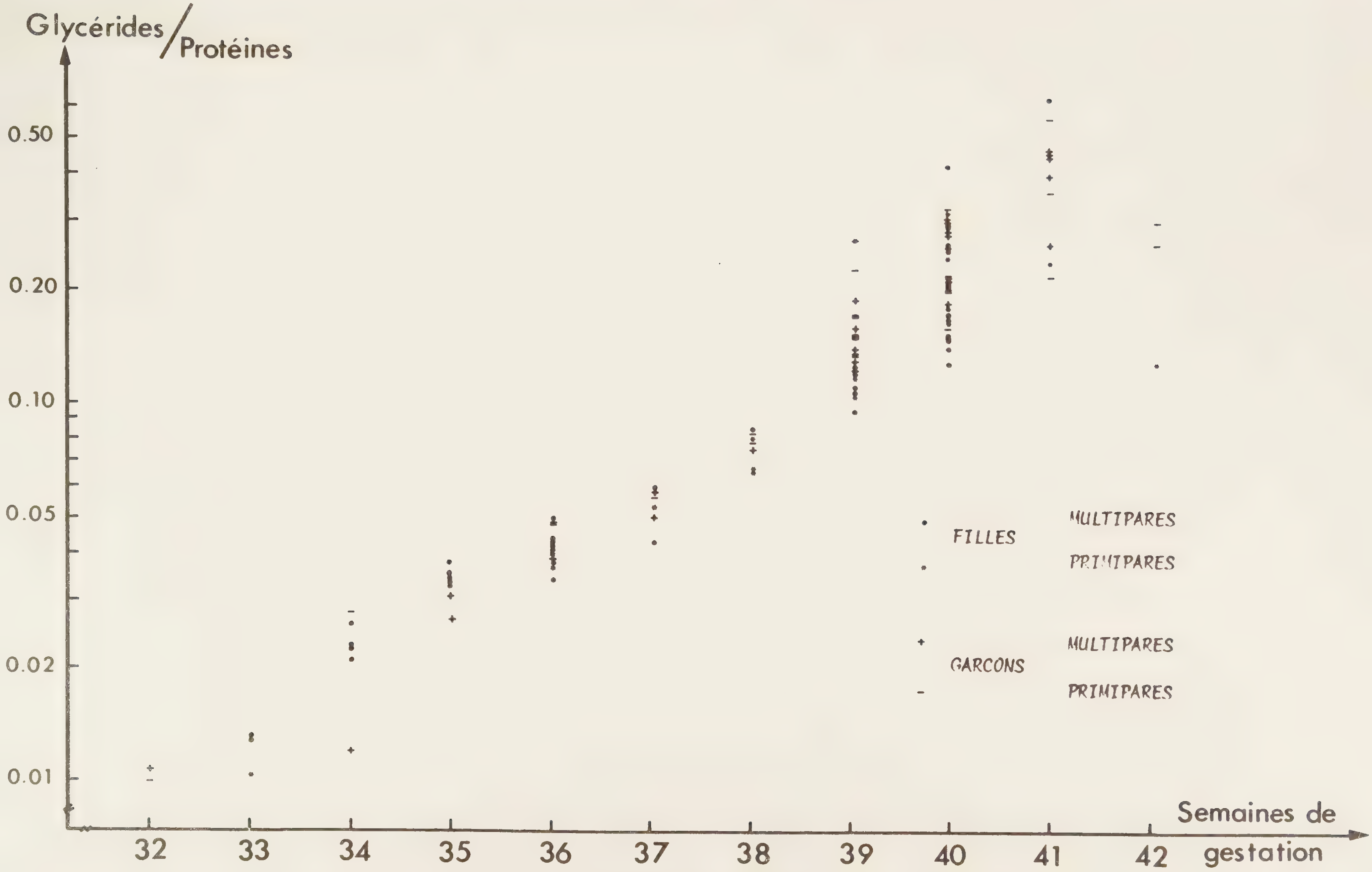
SCHEMA n° 17


Glycèrides/Protéines
0.50
0.20
0.10
0.05
0.02
0.01
Grossesses Compliquées
PREDIABETIQUE
DIABETIQUE
ISOIMMUNISATION RHESUS
HYDRAMNIOS
HEMATOME RETROPLACENTAIRE
ANENCEPHALE
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
Semaines de gestation

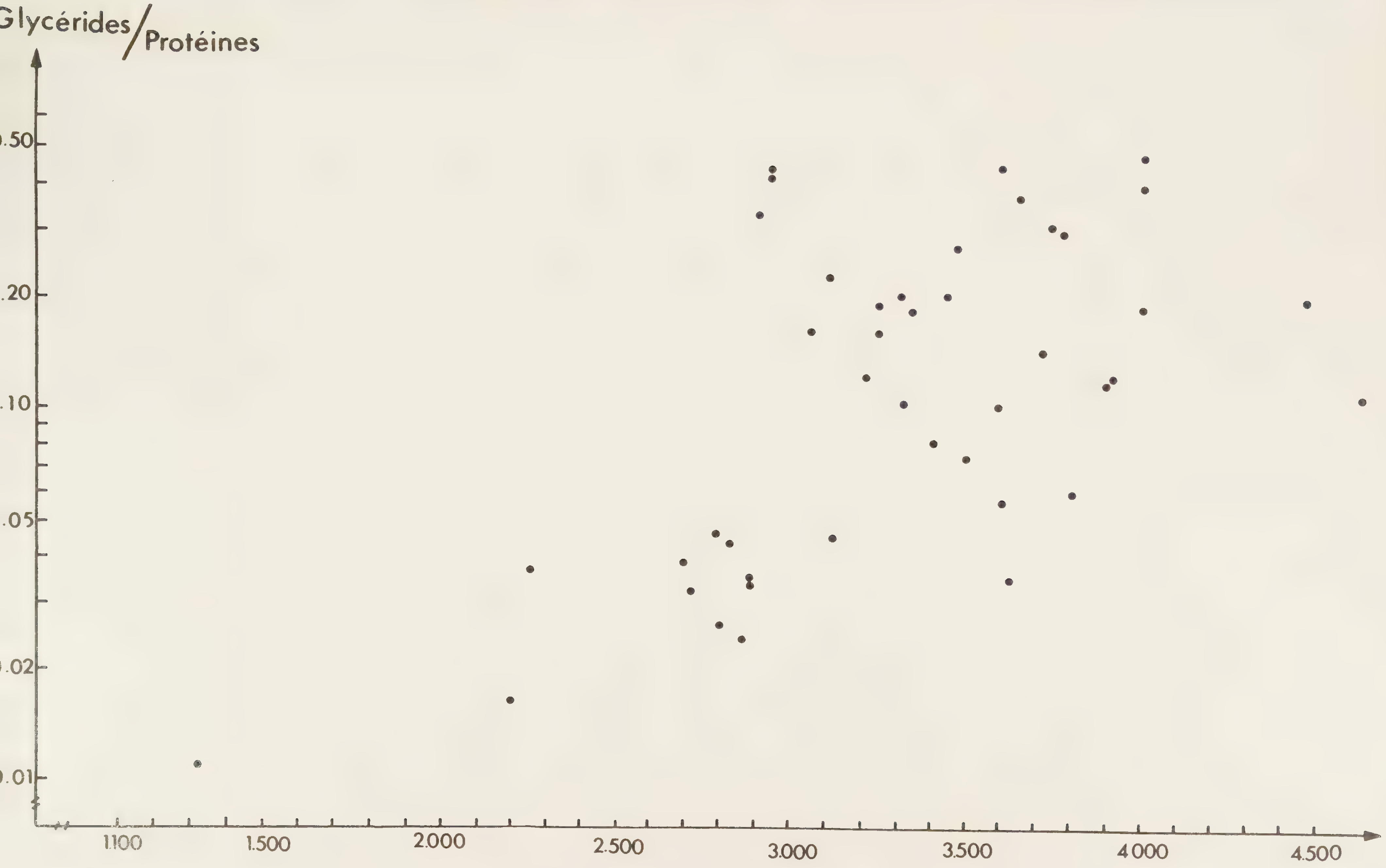
SCHEMA n° 16


Glycérides/Protéines
0.50
0.20
0.10
0.05
0.02
0.01
Age menstruel
Semaines de gestation
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

SCHEMA n° 17


Glycérides/Protéines
0.50
0.20
0.10
0.05
0.02
0.01
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
Semaines de gestation
FILLES
MULTIPARES
PRIMIPARES
GARCONS
MULTIPARES
PRIMIPARES

SCHEMA n° 18


Glycérides/Protéines
0.50
.20
.10
.05
0.02
0.01
1100
1.500
2.000
2.500
3.000
3.500
4.000
4.500
Poids de naissance (g)

SCHEMA n°19

III. DISCUSSION

La multiplicité des méthodes proposées pour mesurer la maturation foetale montre bien l'incertitude de cette estimation. Malgré leur intérêt indéniable les techniques utilisées jusqu'alors ne possédent pas toujours la précision souhaitée et ne sont pas exemptes de diverses causes d'erreur.

Des écueils importants existent lors de la détermination des pourcentages de cellules orangées dans le liquide amniotique :

- après 38 semaines les cellules sont fréquemment groupées en amas, en "nuages", le nombre de cellules contenues dans ces amas est difficile à apprécier et certains auteurs ne prennent en considération que les cellules isolées (6, 27).
- les goutelettes lipidiques sont parfois si nombreuses qu'elles cachent toute structure cellulaire rendant ainsi tout comptage impossible (131).
- bien qu'elles semblent donner une bonne indication de la maturation ces gouttelettes ne sont pas prises en compte dans le calcul du pourcentage.

Ces difficultés techniques expliquent que dans un même laboratoir selon le même protocole, les résultats trouvés pour un même échantillon diffèrent grandement selon la personne pratiquant l'examen (103).

De plus dans un nombre non négligeable de cas cette méthode conclu à des âges gestationnels nettement inférieurs aux valeurs réelles (23).

Les variations de concentration de sphingomyèline font perdre au rapport lécithine/sphingomyèline une partie de son intérêt. Par ailleurs, les mesures sont très perturbées par la présence de sang ou de méconium. Dans certains cas pathologiques, il n'est pas rare qu'un rapport supérieur à 2 puisse correspondre à un syndrome des membranes hyalines et les valeurs intermédiaires comprises entre 0,5 et 2 sont toujours délicates d'interprétation.

Les méthodes reposant sur le dosage d'un seul composé de surnageant (créatinine, bilirubine) sont soumises à l'influence des variations de volume du liquide amniotique et perdent tout leur intérêt lors d'hydramnios et d'oligoamnios (40).

Le dosage de la bilirubine n'est pas utilisable lorsque le liquide est teinté par le sang ou le méconium.

Pour parer à toutes ces difficultés, certains auteurs ont proposé de ne conclure qu'à partir d'une association d'au moins deux index :

- créatininamnie et contingent cellulaire (51)
- créatininamnie et contingent cellulaire et points épiphysaires d'ossification (89).
- créatininamnie, contingent cellulaire et osmolalité (69).

Nous n'avons pas eu la prétention de vouloir remplacer par une méthode unique toutes les techniques précédemment proposées. Nous avons cependant voulu signaler l'intérêt que pouvait avoir la détermination du rapport glycérides saponifiables/protéines dans le contingent cellulaire du liquide amniotique.

Bien que l'étude des cellules orangées ait depuis 1963 attiré l'attention sur le contenu lipidique des cellules du liquide amniotique, peu de travaux ont été consacrés à l'analyse spécifique du sédiment. Les recherches portant sur les triglycérides amniotiques n'avaient pas permis jusqu'alors d'établir de corrélation entre ces composés et la maturation foetale, probablement parce qu'elles portaient sur le surnageant (102) ou sur un sédiment préparé dans des conditions peu satisfaisantes de centrifugation (13, 132).

A notre connaissance, notre étude est la première à mettre en évidence une corrélation entre les glycérides des cellules du liquide amniotique et le terme (53).La détermination du rapport que nous présentons comme un éventuel index de maturation foetale ne

nécessite pas la mise en oeuvre d'un appareillage très complexe ni trop couteûx. Bien que certaines étapes, en particulier la préparation du sédiment soient quelque peu délicates, la réalisation des dosages est simple et rapide. A condition que le laboratoire soit prévenu avant que l'amniocentèse soit pratiquée et qu'une personne familière avec cet examen soit disponible, le résultat de l'analyse devrait pouvoir être facilement obtenu au cours de la journée.

Etant donné la fréquence des échantillons souillés par le méconium ou par le sang un avantage de la technique décrite est le fait qu'elle semble peu perturbée par la présence de ces deux contaminants. Il reste cependant à préciser d'une manière objective les limites dans lesquelles ces contaminations sont tolérables.

L'étude de la corrélation entre le rapport glycérides/protéines et l'âge gestationnel n'a pas montré de différences entre les échantillons provenant de grossesses normales et de grossesses compliquées. Il serait donc possible par cette méthode de déterminer l'âge foetal non seulement au cours des grossesses normales, ce qui ne présente guère qu'un intérêt théorique, mais également dans les cas pathologiques c'est à dire dans les circonstances même où la connaissance de l'âge gestationnel s'avère nécessaire.

Malgré le petit nombre de cas dans chaque groupe d'âge, on est tenté au vu des premiers résultats d'établir des "normes" provisoires. Nous avons pour le rapport glycérides/protéines arbitrairement choisi une série de valeurs et recherché dans quelle classe d'âge gestationnel chacune d'entre elle pouvait rentrer. On obtient ainsi le tableau ci-dessous :

glycérides/protéines	âge gestationnel en semaines
0,020	34
0,030	35
0,040	36
0,050	37
0,075	38
0,100	39
0,200	39 à 40
0,300	40 à 41

Ces valeurs ont déjà été utilisées en pratique pour l'estimation de l'âge gestationnel. L'examen postnatal de l'enfant n'a pas révèlé de discordance avec les prévisions ainsi données.

Une généralisation de l'utilisation de cette technique nécessite la vérification de ces premiers résultats sur un nombre de cas statistiquement plus conséquent. On pourra alors connaître la confiance que l'on peut accorder à cette méthode. Il faut cependant insister sur le fait qu'il est illusoire d'espérer parvenir à une précision supérieure à celle qui constitue notre base de référence, c'est à dire la détermination postnatale de l'âge foetal. Or cette dernière, rappelons-le n'est possible qu'à plus ou moins une semaine près (119).

Les cellules sur lesquelles portent le dosage sont essentiellemen des cellules de desquamation cutanée foetale. Il est donc légitime de penser que les variations observées au cours de la grossesse sont liées à la maturation du revêtement cutané. Les études histologiques de Sharp (123), celles en microscopie électronique de Catherine Nessmann et Françoise Baverel (107) montrent que l'histologie n'est pas affectée par l'insuffisance placentaire et qu'il n'y a pas de discordance entre l'aspect maturatif de la peau et l'âge gestationnel, même en cas d'hypotrophie foetale sévère (1800 g à 40 semaines). La maturité cytologique est indépendante du poids (72) et uniquement en rapport avec l'âge du foetus (67). Ces constatations expliquent que le rapport glycérides/protéines dans le contingent cellulaire ne varie lui aussi qu'en fonction de l'âge et non du poids ou des facteurs d'hypotrophie.

L'âge déterminé par ce rapport chez les enfants hypotrophiques "small for date" devrait donc correspondre à leur âge réel. L'utilisation de cette méthode pourrait ainsi contribuer au diagnostic différentiel entre prématurité et dysmaturité.

Le liquide amniotique s'est avéré être un matériel de choix pour l'étude de la maturité foetale. Dans cette optique deux aspects différents du liquide amniotique peuvent être envisagés. On peut tout d'abord le considérer comme le liquide qui baigne le foetus,

recueille ses secrétions et excrétats. Les modifications métaboliques liées à la maturation pourront donc être reflétées d'une façon indirecte par les variations de concentration dans le liquide amniotique de certains éléments caractéristiques. Cette voie d'approche se heurte à de nombreux écueils dus à la diffusion des substances étudiées, dus à la participation du métabolisme des tissus maternels à la composition du liquide, dus enfin au fait que l'on ne saisit ainsi que des instantanés d'un phénomène complexe soumis à de nombreuses influences.

On peut d'une façon différente voir dans le liquide amniotique une source de cellules foetales. Or, la maturation du foetus est précisément la résultante de transformations qui s'opérent d'abord au sein de ses cellules constitutives. Ces dernières seront donc le lieu d'élection de l'étude de la maturité foetale. C'est dans cette seconde voie que s'est engagé notre travail.

Les cellules recueillies dans le liquide amniotique étant essentiellement constituées de cellules de desquamation cutanée, on pourra estimer la maturité foetale de façon précoce et continue car, précisément, la peau subit une maturation débutant tôt dans la gestation et évoluant de façon très progressive jusqu'à la dernière semaine.

Dans certains cas, cette image du foetus risque d'être insuffisante, trop limitée. En effet, il ne faut pas négliger l'éventualité d'une dissociation entre l'évolution cutanée et celle d'autres organes ou tissus dont la maturation est particulièrement importante (système nerveux, poumons, foie...)

Est-ce rêver que d'espèrer pouvoir un jour recueillir des cellules provenant d'autres tissus afin d'aboutir à une étude plus complète de la maturité foetale ?

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Les cellules lipidiques du liquide amniotique, essentiellement d'origine cutanée foetale, sont apparues comme le matériel de choix pour l'estimation de l'âge gestationnel.

Une analyse préliminaire des lipides du liquide amniotique a montré l'importance quantitative des triglycérides, leur localisation élective dans le contingent cellulaire et leur augmentation au cours de la grossesse.

Une technique d'isolement des cellules du liquide amniotique a été mise au point. Une centrifugation douce ne dépassant pas 100 g est l'étape essentielle de cette préparation.

La méthode enzymatique de dosage des triglycérides a été adaptée à la mesure des glycérides contenus dans le culot cellulaire.

Le rapport glycérides/protéines dans le culot de centrifugation est proposé comme une façon commode d'exprimer la valeur du contenu cellulaire en glycérides. L'utilisation de ce rapport évite la mesure des volumes des culots et permet de comparer les résultats obtenus sans tenir compte de la teneur en cellules des divers liquides étudiés.

Le rapport glycérides/protéines a été déterminé dans 112 échantillons provenant de 62 grossesses normales et 50 grossesses compliquées. L'âge gestationnel au moment de la ponction a été établi rétrospectivement, à la naissance sur des critères pédiatriques.

Le logarithme du rapport glycérides/protéines est apparu comme une fonction de l'âge gestationnel aussi bien dans les cas normaux que dans les cas pathologiques.

Ce rapport est considéré comme une expression de la maturité cutanée foetale.

Vu et permis d'imprimer
Dijon, le 16 sept. 1974

Le Doyen

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. ALCINDOR L.G., BEREZIAT G., VIELH J.P., GAUTRAY J.P.
Le rapport de concentration acide palmitique sur acide stéarique indicateur de la maturité pulmonaire foetale.
Clin. Chem. Acta., 50, 31-34, 1974.

2. ANDERSON A.B.M., GRIFFITHS A.D.
Estimation of duration of gestation by amniotic fluid cytology.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 75, 300-301, 1968.

3. ANDREWS B.F.
Amniotic fluid studies to determine maturity.
Pediatric clinics of North America, 17, 49-66, 1970.

4. ASSALI N. S.
Biology of gestation, vol. 2, Acad. Press , Ed.; New York, 1968.

5. AVERY M.E., MEAD J.
Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease.
Amer. J. Dis. Child., 97, 517-523, 1959.

6. BARNETT H.R., NEVIN M.
The value of the nile blue test in estimating fetal maturity in normal and complicated pregnancies.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 77, 151-155, 1970.

7. BEGNEAUD W.P., HAWES T.P., MICKAL A., SAMUELS M.
Amniotic fluid creatinine for prediction of fetal maturity
Obstet. Gynec., 34, 7-13, 1969.

8. BEISCHER N.A., EVANS J.H., TOWNSEND L.
Studies in prolonged pregnancy. I. The incidence of prolonged pregnancy.
Amer. J. Obstet. Gynec., 103, 476-503, 1969.

9. BENTREM G.C., PERKINS P., WAXMAN B.
Newer methods of evaluating fetal maturity
Amer. J. Obstet. Gynec., 106, 917-919, 1970.

10. BHAGWANANI S.G., FAHMY D., TURNBULL A.C.
Prediction of neonatal respiratory distress by estimation of amniotic fluid lecithin.
Lancet 1, 159-162, 1972.

11. BHAGWANANI S.G. FAHMY D., TURNBULL A.C.
Bubble stability test compared with lecithin assay in prediction of respiratory distress syndrome
Brit. Med. J., 1,697-700, 1973.

12. BIEZENSKI J.J. POMERANCE W., GOODMAN J.
Studies on the origine of amniotic fluid lipids. I. Normal composition.
Amer. J. Obstet. Gynec., 102, 853-861, 1968.

13. BIEZENSKI J.J.
Origine of amniotic fluid lipid.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 142, 1326-1328, 1973.

14. BIEZENSKI J.J.
Amniotic fluid phospholipids in early gestation
Obstet. Gynec., 41, 825-828, 1973.

15. BISHOP E.H., CORSON S.
Estimation of fetal maturity by cytologic examination of amniotic fluid.
Amer. J. Obstet. Gynec., 102, 654-664, 1968.

16. BISHOP E.H., POLLOCK T.
Fetal exfoliative cytology
Obstet. Gynec., 35, 909-911, 1970.

17. BOEHM F.H., SRISUPUNDIT S., ISHII T.
Lecithin-sphingomyelin ratio and a rapid test for surfactant in amniotic fluid : a comparison
Obstet. Gynec., 41, 829-833, 1973.

18. BONSNES R.W.
Composition of amniotic fluid.
Clin obstet. Gynec. 9, 440-448, 1966.

19. BONSNES R.W.
Antenatal Diagn. Symp. 1970, 3-16. R.I. Dorfman, ed., Albert. Univ. Chicago Press, Chicago,Ill., Publisher ,1972.

20. BORER R.C., GLUCK L., FREEMAN R.K., KULOVICH V.M.
Antenatal prediction of the respiratory distress syndrome
Pediatr. Res., 5, 655-661, 1971.

21. BROSENS I., GORDON H., BAERT A.
The estimation of maturity by cytological examination of the liquor amnii.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 73, 88-90, 1966.

22. BROSENS I., GORDON H. et BAERT A.
Prediction of fetal maturity with combined cytological and radiological methods.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 76, 20-26, 1969.

23. BRUBAN P.
La maturité foetale et les cellules du liquide amniotique.
Thèse de Médecine, Paris VI, Saint Antoine, n° 16, 1971.

24. CADERAS DE KERLEAU J.
Comptes rendus de la Séance du 19 juin 1973 de l'Académie de Médecine
Nouv. Presse Med., 38, 2512, 1973.

25. CASAER P., AKIYAMA Y.
The estimation of the post-menstrual age : a comprehensive review.
Develop. Med. Child. Neurol., 12, 697-729, 1970.

26. CEDARD L., CENTENE J., AMIEL-TISON C., HENRION R.
Assessment of fetal lung maturity by amniocentesis with the lecithin/sphingomyelin ratio.
Amer. J. Obstet. Gynec., 115, 275-276, 1973.

27. CENTENE J.
Valeur de l'examen macroscopique et microscopique du liquide amniotique pour le diagnostic de la durée de la gestation.
Thèse de Médecine, Paris V, Cochin Port-Royal, n° 82, 1971.

28. CENTENE J., CEDARD L., HENRION R., TCHOBROUTSKY C., AMIEL-TISON C., VARANGOT J.
Le rapport lécithine/sphingomyéline dans le liquide amniotique : un nouvel élément d'appréciation de la maturité foetale in utéro.
J. Gyn. Obst. Biol. Repr., 1, 407-416, 1972.

29. CENTENE J.,HENRION R.
Cytologie du liquide amniotique.
Vie Médicale, 2, 1077-1080, 1973.

30. CENTENE J., CEDARD L., CHAVINIE J.
Créatinine amniotique et maturité foetale.
Vie Médicale, 2, 1093-1098, 1973.

31. CLEMENTS J.A.
Surface tension of lung extracts.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 95,170-172, 1957.

32. CLEMENTS J.A., PLATZKER A.C.G., TIERNEY D.F., HOBEL C.J., CREASY R.K., MARGOLIS A.J., THIBEAULT D.W., TOOLEY W.H., OH W.
Assessment of the risk of the respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid.
N. Engl. J. Med., 286, 1077-1082, 1972.

33. COHEN I.
Origine tissulaire des cellules du liquide amniotique.
La Presse Médicale, 79, 2539-2540, 1971.

34. CONDORELLI S., COSMI E.V., SCARPELLI E.M.
Extrapulmonary source of amniotic fluid phospholipids
Amer. J. Obstet. Gynec., 118, 842-848, 1974.

35. CURTIS J.D., COHEN W.N., RICHERSON H.B., WHITE C.A.
The importance of placental localization preceding amniocentesis.
Obstet. Gynec., 40, 194-198, 1971.

36. CREASMAN W.T., LAWRENCE R.A., THIEDE H.A.
Fetal complications of amniocentesis.
J.A.M.A., 204, 91-94, 1968.

37. DELECOUR M., MONNIER J.C., CODACCIONI X.
Connaissances actuelles sur la physiologie et la biochimie du liquide amniotique.
Gyn. Obst., 69, 511-525, 1970.

38. DELSAL J.L.
Nouveau procédé d'extraction des lipides du sérum par le méthylal. Application aux microdosages du cholestérol total, des phosphoaminolipides et des protéines.
Bull. Soc. Chim. Biol., Paris, 26, 99-105, 1944.

39. DONALD I.R., FREEMAN R.K., GOEBELSMANN H., CHAN W.H., NAKAMURA R.M.
Clinical experience with the amniotic lecithin/sphingomyelin ratio : antenatal prediction of pulmonary maturity.
Amer. J. Obstet. Gynec., 115, 547-552, 1973.

40. DONNAI P., GORDON H., HARRIS D.A., HUGUES E.A.
Further studies in the assessment of gestational age by amniotic fluid analysis.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 78, 603-609, 1971.

41. DORAN T.A., BJERRE S., PORTER C.J.
Creatinine, uric acid and electrolytes in amniotic fluid.
Amer. J. Obstet. Gynec., 106, 325-332, 1970.

42. DOSHI N.S., ANSARI A.H.A.
Amniotic fluid cytology for assessment of fetal maturity.
Ohio-State Med. J., 68, 363-366, 1972.

43. DROEGEMUELLER W., JACKSON C., MAKOWSKI E.L., BATTAGLIA F.C.
Amniotic fluid examination as an aid in the assessment of gestational age.
Amer. J. Obstet. Gynec., 104, 424-428, 1969.

44. DUNNIGAN M.G.
The Nile blue sulfate.
Stain Technol., 43,243-249, 1968.

45. EGGSTEIN M., KREUTZ F.H.
Eine neue Bestimmung der Neutrofette in Blutserum und gewebe.
Klin. Wschr., 44, 262-266, 1966.

46. FARR V., MITCHELL R.G., NELIGAN G.A., PARJIN J.M.
Definition of some external characteristics in the assessment of gestational age in the newborn enfant.
Develop. Med. Child. Neurol., 8, 507-511, 1966.

47. FLEXNER L.B., COWIE D.B., HELLMAN L.A., WILDE W.S., VOSBURGH G.J.
The permeability of the human placenta to sodium in normal and abnormal pregnancies and the supply of sodium to the fetus as determined with radioactive sodium.
Amer. J. Obstet. Gynec., 55, 469-480, 1948.

48. FLOYD W.S., GOODMAN P.A., WILSON A.
Amniotic fluid filtration and cytology.
Obst. Gynecol., 34, 583-591, 1969.

49. FOULDS J.W., PENNOCK C.A.
Amniotic fluid creatinine : an unreliable index of fetal maturity.
J. Obstet. Gynaec. Brit.Cwlth., 79, 911-915, 1972.

50. FREDA C.
The amniocentis
Amer. J. Obstet. Gynec., 92, 341-342, 1965.

51. FRIEND J.
Liquor amnii and foetal maturity
J. Reprod. Fert., 23, 369-373, 1970.

52. GAMBERT Ph.
Maturité foetale et lipides du liquide amniotique. Recherche d'une méthode de dosage biochimique des constituants cellulaires.
Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie Appliquée, Faculté des Sciences, Dijon 1973.

53. GAMBERT Ph., PELIKAN P., JAHIER J., PADIEU P.
Un nouvel index de la maturité foetale. Le rapport glycérides saponifiables/protéines dans les cellules isolées du liquide amniotique.
XXVème Congrès de la Fédération des Sociétés de Gynécologie et d'Obstétrique de Langue Française, Montréal 23-28 septembre 1974.

54. GAUTHIER C., DESJARDINS P., McLEAN C.
Fetal maturity : amniotic fluid analysis correlated with neonatal assessment.
Amer. J. Obstet. Gynec., 112, 344-350, 1972.

55. GIRAUD J.R., MURAINE J., DEKHILI L., REISS D., GOMBERT J.
Composition du liquide amniotique en fin de grossesse.
J. Gyn. Obst. Biol. Repr., 2, 243-254, 1973.

56. GIRAULT A., GIRAULT M., GROSIEUX P., LE LIRZIN R., ROUCHY R.
Les lipides du liquide amniotique
Revue Franç. Gynec., 69, 187-192, 1974.

57. GLUCK L., MOTOYAMA E.K., SMITS H.L., KULOVICH M.V.
The biological development of surface activity in mammalian lung.
I : the surface active phospholipids ; the separation and distribution of surface active lecithin in the lung of the developping rabbit fetus.
Pediatr. Res., 1, 237-246, 1967.

58. GLUCK L., KULOVICH M., BORER R.C., BRENNER P.M., ANDERSON G.G., SPELLACY W.N.
Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis
Amer. J. Obstet. Gynec., 109,440-445, 1971.

59. GLUCK L.
Surfactant
Pediat. Clin. N. Amer., 19, 325-331, 1972.

60. GOLDSTEIN A.S., FUKUNAGA K., MALACHOWSKI N., JOHNSON J.D.
A comparison of the lecithin/sphingomyelin ration and shake test for estimating fetal pulmonary maturity.
Amer. J. Obstet. Gynec., 118, 1132-1135, 1974.

61. GORDON H., BROSENS I.
Cytology of amniotic fluid : a new test for fetal maturity.
Obstet. Gynecol., 30, 652-656, 1967.

62. GUERRERO R., FLOREZ P.E.
The duration of pregnancy.
Lancet, 2, 268-269, 1969.

63. GUSDON J.P., WAITE B.M.
A colorimetric method for amniotic fluid phospholipids and their relationship to the respiratory distress syndrome.
Amer. J. Obstet. Gynec., 112, 62-71, 1972.

64. HANON F., COQUOIN-CARNOT M., PIGNARD P.
Le liquide amniotique
Revue générale des travaux et publications, 1955-1960.
Gynec. Obstet., 60, 211-236, 1961.

65. HARTREE E.F.
Determination of proteins. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response.
Anal. Biochem., 48, 422-427, 1972.

66. HAWORTH S.G., MILIC A.B., ADAMSONS K.
Biochemical indices of fetal condition.
Clin. Obstet. Gynec., 11,1182-1205, 1968.

67. HENRION R., J. CENTENE
A propos de la détermination du terme de la grossesse par l'étude des cellules du liquide amniotique.
Bull. Soc. Gyn. Obst., 22, 393-443, 1970.

68. HENRION R., CEDARD L., CENTENE J.
Rapport lécithine/sphingomyéline et maturité foetale.
Vie Médicale, 10, 1083-1090, 1973

69. HORGER E.O.
Amniotic fluid maturity index
Southern Med. J., 65, 299-301, 1972

70. HOYES A.D.
Ultrastructure of the cells of the amniotic fluid.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 75, 164-171, 1968.

71. HUISJES H.J.
Origin of the cells in the liquor amnii
Amer. J. Obstet. Gynec., 106, 1222-1228, 1970.

72. HUISJES H.J., ARENDZEN J.H.
Estimation of fetal maturity by cytologic evaluation of liquor amnii.
Obstet. Gynec., 35, 725-729, 1970.

73. HUSSAIN O.A.N., SINCLAIR L.
Estimation of maturity in the foetus and newborn
Proc. Roy. Soc. Med., 64,1213-1217, 1971.

74. JAKOBOVITS I., FARKAS M., PIUKOVICH J.
Cytologic patterns and creatinin concentration of the amniotic fluid.
Acta Cytol., 16, 381-386, 1972.

75. JOHNSON J.H., UNONSKY R., ALPER P., EVERETT C.A., GREENSPAR H.
Amniotic fluid proteins : material and fetal contributions.
Pediatrics., 84, 588-593, 1974.

76. KABACH M.M., LEONARD C.O., PARMLEY T.H.
Intrauterine diagnosis : comparative enzymology of cells cultivated from maternal skin, fetal skin, and amniotic fluid cells.
Pediat. Res., 5, 366-371, 1971.

77. KELLUM R.E., TOSHITANI S., STRANGFELD K.
Human sebaceous glands metabolism.
J. Invest. Dernatol., 60 ,52-56, 1973.

78. KITTRICH M.
Zytodiagnostik des Fruchtwasserabflusses mit Hilfe von Nillau.
Geburtsh Frauenheil, 23, 156, 1963.

79. KYASU J.Y., MATHUR M., RAM E.
Considerations upon pulmonary lecithin/sphingomyelin ratio in amniotic fluid.
Clin. Chem., 19, 1224-1225, 1973.

80. LAATIKAINEN T., HOKHANEN T., HAAHTI E.
Determination of amniotic fluid lecithin with a gas phase thin layer chromatographic detector.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 31, 347-351, 1973.

81. LEVI S.
Estimation de l'âge foetal. Etude comparative des méthodes.
J. Gyn. Obst. Biol. Repr., 2, 303-322, 1973.

82. LEVI S., SMETS Ph.
Intrauterine fetal growth by ultrasonic biparietal measurements : the percentiles of B.P. distribution.
Acta Obstet. Gynec. Scand., 52, 193-198, 1973.

83. LEVI S., SMETS Ph., De BUYL M.
Valeur de l'estimation de l'âge foetal par les ultrasons.
Rev. Franç. Gynec., 69, 13-17, 1974.

84. LILEY A.W.
Liquor amni analysis in the managment of the pregnancy complicated by rhesus sensitization.
Amer. J. Obstet. Gynec., 82,1359-1370, 1961.

85. LIND T., PARKIN F.M., CHEYNE G.A.
Biochemical and cytological changes in liquor amnii with advancing gestation.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 76, 673-683, 1969.

86. LIND T.
Diagnostic uses of amniocentesis in late pregnancy.
Proc. Roy. Soc. Med., 64, 1140-1141, 1971.

87. LIND T., BILLEWICZ W.Z., CHEYNE G.A.
Composition of amniotic fluid maternal blood through pregnancy
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 78, 505-512, 1971.

88. LISON H.
Histochimie et cytochimie animales, 3ème édit., Gauthier-Villars, Ed. Paris, 1960.

89. LISTER U.M.
Ultrastructure of the human amnion, chorion and fetal skin.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 75, 327-341, 1968.

90. LOWRY OH., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J.
Protein measurement with Folin-phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.

91. MAGNIN P., LANSAC J., SAUZAY F.
Notre score de maturité foetale.
Gyn. Obst., 70, 551-555, 1971.

92. MANDELBAUM B., EVANS T.N.
Life in the amniotic fluid.
Amer. J. Obstet. Gynec., 104, 365-377, 1969

93. MANGERY D., JARDILLIER J.C., DE PAILLERETS F., LESTRADET H.
Intérêt de la détermination des phospholipides dans le liquide amniotique comme test de maturation du poumon foetal.
Arch. Fr. Péd., 29, 575-581, 1972.

94. MERKUS J.M., KOCK H.C., MERKUS F.W., VERKOEVEN A.G., BEYSENS A.J.
Evaluation of the amniotic fluid test and its relationship to the respiratory distress syndrome.
Amer. J. Obstet. Gynec., 115, 859-861, 1973.

95. MEROLA J.C.L., JOHNSON L.M., BOLOGNESE R.J., CORSON S.L.
Determination of fetal pulmonary maturity by amniotic fluid lecithin/sphingomyelin ratio and rapid shake test.
Amer. J. Obstet. Gynec., 119, 243-252, 1974.

96. MINKOWSKI A., LARDINOIS R.
Determination postnatale de l'âge gestationnel. Ages clinique, osseux, biologique.
Journées Parisiennes de Pédiatrie, 337-341, 1970. Flammarion Ed. Paris.

97. MORGAN T.E.
Pulmonary surfactant
N. Engl. J. Med., 284, 1185-1193, 1971.

98. MORRISON R.L., RUH T.
A method for determination of lecithin and sphingomyelin in amniotic fluid.
Amer. J. Obstet. Gynec., 118, 493-495, 1974.

99. NAKAMURA J., ROUX J.F., BROWN E.G. SWEET A.Y.
Total lipids and the lecithin-sphingomyelin ratio of amniotic fluid : an antenatal test of lung immaturity.
Amer. J. Obstet. Gynec., 113, 363-366, 1972.

100. NAKAMURA J., ROUX J.
Determination of amniotic fluid phospholipids for the diagnosis of fetal maturation.
Amer. J. Obstet. Gynec., 119, 104-110, 1974.

101. NELSON G.H.
Amniotic fluid phospholipid patterns in normal and abnormal pregnancies
Amer. J. Obstet. Gynec., 105,1072-1077, 1969.

102. NELSON G.H., FREEDMAN M.A.
Relationship between amniotic fluid triglyceride levels and fetal maturity
Amer. J. Obstet. Gynec., 111, 930-933, 1971.

103. NELSON G.H., GOODRICH S.M., MARTIN T.R., EDUARDO TALLEDO O., FREEDMAN M.A.
The study of amniotic fluid.
Estimation of fetal maturity by amniotic fluid analyses.
Southern Med. J., 64, 1-7, 1971.

104. NELSON G.H.
Relationship between amniotic fluid lecithin concentration and respiratory distress syndrome.
Amer. J. Obstet. Gynec., 112, 827-830, 1972.

105. NELSON G.H.
Determination of amniotic fluid total phospholipids phosphorus as a test for fetal lung maturity.
Amer. J. Obstet. Gynec., 115, 933-941, 1973

106. NERDRUM T.A., L. TERVILLA
Estimation of fetal maturity by amniotic fluid cytology.
Ann. Chir. Gynaec. Fenn., 60, 81-84, 1971.

107. NESSMANN C., BAVEREL F.
Le développement de la peau chez l'embryon et le foetus humains.
Etude Histologique.
J. Gyn. Obst. Biol. Repr., 1, 527-550, 1972.

108. NIELAND M.L., PARMLEY T.H., WOODRUFF J.D.
Ultrastructural observations on amniotic fluid cells.
Amer. J. Obstet. Gynec., 108, 1030-1042, 1970.

109. PARMLEY T., MILLER E.
Fetal maturity and amniotic fluid analysis.
Amer. J. Obstet. Gynec., 105, 354-362, 1969.

110. PELIKAN P., JAHIER J., M. GAULIARD
L'amniocentèse dans le dépistage de la souffrance foetale chronique.
Rev. Franç. Gynec., 65, 625-637, 1970.

111. PITKIN R.M., ZWIREK S.J.
Amniotic fluid creatinine
Amer. J. Obstet. Gynec., 98, 1135-1139, 1967.

112. PITKIN R.M.
Prenatal estimation of fetal maturity.
Internat. J. Gynaec. Obstet., 4, 199-206, 1969.

113. PRITCHARD E.T., ARMSTRONG W.D., WILT J.C.
Examination of lipids from amnion, chorion and vernix.
Amer. J. Obstet. Gynec., 100, 289-298, 1968.

114. ROSENTHAL A.F., HAN S.Ch.
Phosphorus determination in glycerophosphatides from thin-layer chromatograms.
Lipid. Res., 10, 243-247, 1969.

115. ROSENTHAL A.F., VARGAS M.G., SCHIFF S.V.
Comparison of four indexes to fetal pulmonary maturity
Clin. Chem., 20, 486-491, 1974

116. ROUX J.F., NAKAMURA J., BROWN E.G.
Further observations on the determination of gestational age by amniotic fluid analysis.
Amer. J. Obstet. Gynec., 116, 633-638, 1973.

117. ROUX J. F., NAKAMURA J., BROWN E.
Assessment of fetal maturation by the foam test
Amer. J. Obstet. Gynec. 117, 280-283, 1973.

118. RYAN G.T., IVY R., PEARSON J.W.
Fetal bleeding as a major hazard of amniocentesis.
Obstet. Gynec., 40, 702-707, 1972.

119 SAINT-ANNE DARGASSIES S.
Determination neurologique de l'âge foetal néonatal.
Journées Parisiennes de Pédiatrie., 311-326, 1970.
Flammarion Ed. Paris.

120. SARKOSI L., KOVACS H.N., FOX H.A., HERENY I.T.
Modified method for estimating the phosphatidylcholine/sphingomyelin ratio in amniotic fluid and its use in the assessment of fetal lung maturity.
Clin. Chem., 18, 956-960,1972.

121. SCHMIDT F.H., DAHL K.V., HEIDRICH P., STORK H.
Enzymatic determination of triglycerides in blood serum and blood glucose by automated methods.
Organisation des Laboratoires, Biologie Prospective, IIème Colloque de Pont à Mousson, 1972.
L'expression Scientifique Française, Ed. Paris.

122. SCHUMACHER J.CL., MULLER G., MAYER D., De MOT E., GANDAR R.
La cytologie du liquide amniotique comme moyen de détermination de la maturité foetale.
Bull. Fed. Gynec. Obst., 22, 128-129, 1970.

123. SHARMA S.D., R.R. TRUSSELL
The value of amniotic fluid examination in the assessment of fetal maturity
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 77, 215-220, 1970.

124. SHARP F.
Estimation of fetal maturity by amniotic fluid exfoliative cytology.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 75, 812-815, 1968.

125. SHEELEY S.A., TAKAGI L.R., BABIS J.U.
Assessment of surfactant activity in amniotic fluid for evaluation of fetal lung maturity
Amer. J. Obstet. Gynec., 116, 369-376, 1973.

126. SHOR-PINSKER V., SORIA-DIAZ-INFANTE J., MURIETTA-NECOACHEA S., KARCKMER S.
Feto-maternal metabolic relations. Lipids in the amniotic fluid from normal pregnant women.
Gynecol. Obstet. Med., 32, 157-165, 1972.

127. SIRBU P., MORASSI-IONESA F., RACOUITA V.
Valeur de la recherche des cellules oranges du liquide amniotique dans le diagnostic de la grossesse prolongée.
Bull. Fed. Soc. Gynec. Obstet. de langue française, 22,432-433, 1970.

128. SMADJA A., HOANG NGOC MINH, NGUYEN THI LONG
Conception nouvelle sur la physiologie de la circulation amniotique
Rev. Franç. Gynec., 69, 111-114, 1974.

129. SPELLACY W.N., BUHI W.C.
Amniotic fluid lecithin/sphingomyelin ratio as an index of fetal maturity
Obstet. Gynec., 39, 852-860, 1972.

130. STENBÄCK F., OJALA A.
Histochemical properties of amniotic fluid cells.
Acta Cytologica, 13, 389-394, 1969.

131. STENBÄCK F., OJALA A.
Determination of fetal maturity by means of amniotic fluid cells.
Acta Cytologica, 14, 439-443, 1970.

132. SVENDSEN E.K.R., GRUNDT I.
Total lipids and lipid pattern in amniotic fluid and vernix caseosa : a preliminary report.
Acta Obst. Gyn. Scand., 45, suppl. 9, 80-83, 1966.

133. TERVILLÄ L., GOECK C., TIMONEN L.
Cytology of amniotic fluid.
Acta Obst. Gyn. Scand., 52, 235-245, 1973.

134. TESCHER M., MORIN P., ENGELMANN P., ZUFRIDEN J., BERJOAN Y., LEGRAND A.
Le liquide amniotique au cours du troisième trimestre de la grossesse.
Problèmes actuelles de biochimie appliquée, 6ème série, Masson Ed. Paris, 1974.

135. TESCHER M., ZUFRIDEN J., ENGELMAN P., PAOLAGGI F., DELATTRE J. LEGRAND A. et SPINNER L.
Etude de certains constituants du liquide amniotique au cours du dernier trimestre de la grossesse.
Sem. Hôp. Paris, 50, 2148-2156, 1974.

136. TISNES P.
Lipoprotein film on the surface of human skin.
Parfum, Cosmet. Savons Fr., 1, 27-32, 1971

137. TOUCHSTONE J.C., GLAZER L.G., BOLOGNESE R.J., CORSON S.L.
Components of amniotic fluid.
Amer. J. Obstet. Gynec., 114, 85-88, 1972.

138. VAN LEEUVEN L., JACOBY H., CHARLES D.
Exfoliative cytology of amniotic fluid.
Acta Cytologica, 9, 442-445, 1965.

139. VERDER C.H., CLAUSEN H.J.
Assay of phospholipids in amniotic fluid.
Clin. Chem. Acta., 51,257-259, 1974.

140. VOTTA R.A., BOBROW DE GAGNETEN C., PARADA O., GIULIETTI M.
Cytologic study of amniotic fluid in pregnancy
Amer. J. Obstet. Gynec., 102,571-577, 1968.

141. VRETTOS A.S., KOLIOPOULOS C., DASKALAKIS N. et PANAYOTOU P.P.
L'âge de la gestation. Sa détermination par l'examen du liquide amniotique.
J. Gyn. Obst. Biol. Repr., 1, 323-332, 1972.

142. WACHTEL E., GORDON H., OLSEN E.
Cytology of amniotic fluid
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 76, 596-602, 1969.

143. DE WATTEVILLE H., ROSENBLATT R., MIKAMO K.
L'examen cytologique du liquide amniotique
Bull. Soc. Roy Belg. Gynec. Obstet., 38, 325-342, 1968

144. WHITE C.A., DOORENBOS D.E., BRADBURY J.T.
Role of chemical and cytologic analysis of amniotic fluid in determination of fetal maturity.
Amer. J. Obstet. Gynec., 104,664-670, 1969.

145. WOLF P.L., BLOCH D., TSUDAKA T.
Biochemical profile of amniotic fluid to assess fetal maturity.
Clin. Chem., 16, 843-844, 1970.

146. WOYTON R.
Assessment of fetal maturity based on examination of liquor amnii.
Zbl. Gynäk., 85, 552-560, 1963.

147. WYATT T.H., HALBERT D.R., CRENSHAW C.
Estimation of fetal maturity by cytologic examination and creatinine determination of amniotic fluid.
Obstet. Gynec. 34, 772-778,1969.